Institut für Pathologie, Klinikum Charlottenburg
Freie Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Blümcke

Elektronenmikroskopische Untersuchung der Reifung fetalen Lungengewebes in der Gewebekultur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ute Frevert
aus Berlin

Berlin 1983
Journal Nr. 1114

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0051

Institut für Pathologie, Klinikum Charlottenburg
Freie Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Blümcke

Elektronenmikroskopische Untersuchung der Reifung fetalen Lungengewebes in der Gewebekultur

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung
des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ute Frevert
aus Berlin

Berlin 1983
Journal Nr. 1114

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Fachbereichssprecher: Prof. Dr. F. Hörchner

Referent: Prof. Dr. K. Dämmrich

Korreferent: Prof. Dr. S. Blümcke

Tag der Promotion: 10. März 1983

Inhaltsangabe

		Seite
I.	Einleitung	5
II.	Literaturübersicht	
1.	Surfactant - Zusammensetzung und Wirkungsweise	7
2.	Das Hyaline-Membranen-Syndrom	9
	A) Morphologie	9
	B) Klinik	10
	C) Barker-Syndrom	11
	D) Versuchsmodell: Meerschweinchen	11
	E) Beziehungen zwischen Nervensystem und Epithelgeweben	12
3.	Lungenreifung in utero	15
	A) Epitheliale Differenzierung	15
	B) Anatomie der adulten Lunge	19
4.	Gewebe- und Zellkultur der Lunge	21
	A) Gewebekultur: embryonales Lungengewebe	23
	a) Bronchialbaum	24
	b) Mesenchym-Epithel-Beziehung	25
	c) Ausreifung des Enzymmusters des Epithels	29
	d) Morphologische Differenzierung des prospektiven Alveolarepithels	30
	B) Gewebekultur: reifes Lungengewebe	33
	C) Zellkultur	34
	D) Experimentelle und klinische Ansätze zur Reifeförderung	35
	E) Problemstellung	38

III. Material und Methodik
1. Tierversuche 39
2. Gewebekultur 40
3. Morphologische Methoden 42

IV. Ergebnisse
1. Allgemeine Explantatreaktionen 42
2. Verhalten unterschiedlich weit ausgereiften Lungengewebes im Explantat 43
3. Vergleich des Reifestandes gleichalter Gewebsproben nach unterschiedlicher Kulturdauer 55
4. Reifung der Lamellarkörper: Vorstufen, Entwicklungsweg, abnorme Formen 58
5. Einfluß des Acetylcholin-Zusatzes im Kulturmedium 59
6. Zusammenfassung der Ergebnisse 60
7. Bilddokumentation 62

V. Diskussion 80

VI. Zusammenfassung 94

VII. Summary 95

VIII. Literatur 96

Lebenslauf

1. Einleitung

Unter den Erkrankungen der Perinatalperiode steht in der Humanmedizin die respiratorische Insuffizienz an erster Stelle. Sie stellt die wesentliche Todesursache beim Neugeborenen dar. Hierbei gehört das Hyaline-Membranen-Syndrom zu den wichtigen pathologisch-anatomischen Manifestationen der respiratorischen Insuffizienz. Dieses Syndrom betrifft 0,5 bis 2 % aller Neugeborenen (75) und ist insbesondere eine Erkrankung frühgeborener und intrauterin vorgeschädigter Kinder. Die Sterblichkeit ist seit der Einführung der neonatalen Intensivtherapie von früher 40 - 70 % auf heute 10 - 20 % gesunken (75, 163). Die wesentliche Ursache der Entstehung des Hyaline-Membranen-Syndroms (HMS) liegt nach heutigem Wissensstand in einer geweblichen Unreife der Lunge. Diese geht mit einer Unterproduktion eines für die alveoläre Ventilation essentiellen oberflächenaktiven Phospholipidfilmes (Surfactant) einher. Klinische und tierexperimentelle Bemühungen, eine Reifungsbeschleunigung herbeizuführen, müssen heute in ihrem Erfolg noch zurückhaltend beurteilt werden. Aus diesem Sachverhalt ergibt sich die Notwendigkeit detaillierter Kenntnisse der Normalreifung der Lungengewebe, des Studiums der hierbei wirksam werdenden Steuermechanismen und der Übertragung dieser Erkenntnisse auf geeignete Versuchsmodelle, in denen eine mögliche Einflussnahme überprüft werden kann.
Nach dem Studium der Normalreifung des Alveolarepithels an einem hierfür besonders gut geeigneten Labortier, dem Meerschweinchen, war es Gegenstand

UNIV. LEIDEN

der vorliegenden Arbeit, die gewebliche Differenzierung und zelluläre Leistung im Gewebeexplantat von verschiedenen Embryonalentwicklungsstufen ausgehend mit der Normalentwicklung in utero zu vergleichen.

Die gewonnenen Erfahrungen über das Verhalten des Explantates soll eine Bezugsgrundlage bilden für die Überprüfung von verschiedenen Substanzen (Hormone, Transmitter) auf ihre Wirksamkeit im Sinne einer Akzeleration der Epithelreifung.

II. Literaturübersicht

1. Surfactant - Zusammensetzung und Wirkungsweise

Eine Ursache für die beim Hyaline-Membranen-Syndrom erschwerte Atemtätigkeit liegt in einer erhöhten Oberflächenspannung in den peripheren Lungenabschnitten infolge unzureichender Biosynthese, Speicherung und Ausschleusung des Surfactant in den Alveolarraum (12, 58, 87). Diese oberflächenaktive Substanz wird von den Typ-II-Pneumozyten gebildet (11) und liegt als 50 Å starker monomolekulärer Film im Alveolarlumen vor (121). Surfactant wurde bei vielen höheren Tierarten nachgewiesen (123). Es besteht zu 80 - 90 % aus Lipiden - davon wiederum zu 90 - 95 % aus Phospholipiden - und zu 10 - 20 % aus Proteinen (74). Die Sekretion dieser Proteinkomponente soll nach MASSARO (109) auf neurohumoralem Weg stimulierbar sein. Der Hauptbestandteil der Phospholipide ist mit 71 - 75 % Lecithin (74). Im Fruchtwasser lassen sich Lecithin und Sphingomyelin bestimmen, und aus ihrem Quotienten kann auf den Lungenreifestand geschlossen werden.

Die Oberflächenspannung berechnet sich nach dem La Place'schen Gesetz:

$$\text{Druck} = \frac{2 \times \text{Oberflächenspannung}}{\text{Radius}}$$

und steigt in einer Alveole ohne Surfactant-Einfluß mit Zunahme des Alveolendurchmessers. Bei Anwesen-

heit einer oberflächenaktiven Substanz sinkt jedoch der transpulmonale Druck mit abnehmendem Volumen der Alveole nach dem Gesetz (25, 33, 137):

$$\text{Transpulmonaler Druck} = \frac{2 \times (\text{Spannung der Alveolarwand} + \text{Oberflächenspannung})}{\text{Radius}}$$

2. Das Hyaline-Membranen-Syndrom

A) Morphologie

Morphologisch ist beim Hyaline-Membranen-Syndrom ein phasenhafter Ablauf zu beobachten (58).

1. Frühzeitig findet sich ein Nebeneinander belüfteter und atelektatischer Bezirke. Im Bereich der Atelektasen bestehen ein interstitielles Ödem, eine beginnende Desquamation des Alveolarepithels von einer verbreiterten Basalmembran, verstärkte Pinozytose-Aktivität sowie eine Reduktion der Lamellarkörperzahl in den Typ-II-Pneumozyten.
2. Im folgenden lösen sich zunehmend Epithelien ab und liegen eingebettet in einem von Zelltrümmern durchsetzten Alveolarexsudat.
3. Das klassische Bild eines vollentwickelten Hyaline-Membranen-Syndroms zeigt in weiten Arealen neben Atelektasen dilatierte Ductus alveolares. Das Epithel ist teilweise desquamiert, und ausgedehnte hyaline homogene Membranen kleiden die peripheren Luftwege aus. Vereinzelt finden sich noch nicht ausdifferenzierte unbelüftete Alveolarknospen mit einschichtig kubischer Epithelauskleidung. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen das weitgehende Fehlen von Lamellarkörpern in Typ-II-Pneumozyten.
4. In der anschließenden reparativen Phase herrschen zwar noch Bezirke mit interstitiellem Ödem, hyalinen Membranen und Alveolen mit

desquamiertem Epithel vor, jedoch hat teilweise bereits eine Reepithelialisierung der Alveolarräume eingesetzt.
Mitosen treten auf und vereinzelt finden sich intrazellulär osmiophile Granula.

5. Selbst nach längeren Überlebenszeiten werden noch dilatierte Lufträume mit zahlreichen Alveolarmakrophagen neben Atelektasen beobachtet. Ferner finden sich häufig auch Bezirke mit bronchopneumonischen Infiltraten. Das interstitielle Ödem bildet sich zurück. Aufgrund zahlenmäßig vermehrter Fibrozyten bleiben die Alveolarsepten jedoch weiterhin verbreitert und die Diffusionsstrecke vergrößert. Das Alveolarepithel besteht in den minderbelüfteten Bereichen überwiegend aus kubisch transformierten Zellen mit zahlreichen Lamellarkörpern.

B) Klinik

Klinisch manifestiert sich das Hyaline-Membranen-Syndrom meist innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt durch eine zunehmend erschwerte Inspiration. Das Krankheitsbild kann entweder in leichten Fällen nach 12 bis 24 Stunden mit abnehmender Symptomatik ausklingen oder unter Entwicklung einer sich verstärkenden Dyspnoe, Ateminsuffizienz und Zyanose fortschreiten. In diesem Stadium sind die Überlebenschancen ohne Intubation und assistierte Beatmung gering (25).

C) Das Barker-Syndrom

Ein ähnliches Krankheitsbild kann spontan im Tierreich als sog. Barker-Syndrom auftreten: dieses wird nach geburtshilflichen Eingriffen bei ca. 1 % der Vollblutfohlen in der Umgebung von Newmarket in England beobachtet (106, 132). Morphologisch konnten hyaline Membranen zwar in wenigen dieser Fälle nachgewiesen werden, doch hatten die Lungen eine leberartige Beschaffenheit, ausgeprägte Atelektasen, und das weitgehende Fehlen von Surfactant konnte durch den "Bubble-Test" von PATTLE (121) nachgewiesen werden. Weitere spontane Entsprechungen des Hyaline-Membranen-Syndroms sind vereinzelt beim Hund (107), Rind (126) und Schwein (22, 59, 176) aufgetreten.

D) Versuchsmodell Meerschweinchen

Die Provokation des HMS als experimentelles Modell ist auf unterschiedliche Weise möglich. So konnte beim Meerschweinchen ein entsprechendes Krankheitsbild durch O_2-Vergiftung erzeugt werden (7, 8, 24, 44, 118). Beim Schwein ist eine vererbliche Lungenunreife bekannt (22, 59, 119, 176). Vorzeitige Beatmung sowie perinatale Asphyxie (42) und Endotoxämie des Muttertieres (14) führen beim Kaninchen zu vergleichbaren Symptomen. Für Untersuchungen der Beeinflußbarkeit der Lungenreifung erscheint das Meerschweinchen einerseits aufgrund dieses Schrifttums, andererseits wegen seiner relativ langen Tragzeit von etwa 63 Tagen - die eine exakte Abgrenzung der einzelnen embryonalen Reifungsschritte erlaubt - besonders geeignet.

E) Beziehungen zwischen Nervensystem und Epithelgeweben

Die Reifung des intrapulmonalen Nervensystems geht der epithelialen Differenzierung der embryonalen Lungen voraus. Beim Meerschweinchen sprossen bereits unmittelbar nach dem Auftreten der Lungenanlage am 17. SST erste Nervenfasern in die Lungenanlage ein und sind am 22. SST bis in die Peripherie zu verfolgen. Am 27. Schwangerschaftstag sind erste synaptische Strukturen erkennbar. Synapsen sowie "Synapsen auf Distanz" sind am 40. Schwangerschaftstag vollständig ausgebildet (139). Die Neurotransmitter gelangen bei den "Synapsen auf Distanz" durch Diffusion zum Zielgewebe. Dieser Mechanismus der Informationsübertragung wurde für die glatte Muskulatur in Bronchien und Gefäßen nachgewiesen und auch für die pulmonalen Drüsen und Epithelzellen angenommen (18). Die im Verhältnis zur Epitheldifferenzierung frühzeitigere Nervenreifung läßt die Frage nach einer mittel- oder unmittelbaren Beteiligung der Neurotransmitter bei der Steuerung der epithelialen Gewebereifung zu. Von DE JONG und DE HAAN (84) wurde auch eine Korrelation zwischen der Innervation und Differenzierung des Mesenchyms der Lunge zu glatter Muskulatur und Knorpelgewebe zur Diskussion gestellt.

Acetylcholin stellt als Transmitter des autonomen parasympathischen Nervensystems den Kontakt zwischen Nervenzellen einerseits und Zielgeweben andererseits her.

Die Synthese des Acetylcholins aus Acetyl-CoA ist spezies-abhängig über drei verschiedene Vorstufen

(Pyruvat, Acetat und Citrat) möglich und wird stimuliert durch Freisetzung von Transmittervesikeln mit nachfolgender Abnahme des Reserve-Pools (57). Die Bindung des Acetylcholins am nikotinischen oder muskarinischen (120) Rezeptor ist durch einen konzentrationsabhängigen chemischen Gleichgewichtszustand charakterisiert. Das freie Acetylcholin wird von der spezifischen Acetylcholinesterase im synaptischen Spalt von einer unspezifischen, im Blutplasma vorkommenden Pseudo-Cholinesterase innerhalb von Millisekunden hydrolisiert (82). Das dabei freiwerdende Cholin dient der Resynthese.
Bei Untersuchungen der Verteilung cholinergischer und adrenergischer Nervenfasern in der Lunge stellt DIJKSTRA (45, 46) Cholinesterase-positive Fasernetze im Lungenparenchym dar, und GRANDE konnte eine cholinergische Innervation der Bronchien zwar bis zum Bronchus terminalis, nicht aber der Alveolarsepten in den Lungen verschiedener Tiere nachweisen (51, 52, 53, 64).

Experimentell belegte Wirkungen des Acetylcholins in der Lunge sind:

1. Kontraktion der glatten Muskulatur von Trachea und Bronchien (76, 91). (Eserin verstärkt als Acetylcholinesterase-Hemmer diesen Effekt).
2. Spastische Verstärkung von Kontraktionen der glatten Muskulatur, ausgelöst durch submaximale elektrische Stimulation (134).
3. Stimulation der Zilienaktivität des respiratorischen Epithels (auch dieser Effekt ist durch

Eserin potenzierbar) (37).

4. Erhöhung der Oberflächenspannung in den Alveolen der betreffenden Lungenhälfte nach Vagotomie (161, 162).

3. Lungenreifung in utero

A) Epitheliale Differenzierung

Die normale Lungenreifung in utero läßt sich in vier Phasen einteilen (21):

1. Embryonale Phase
2. (Pseudo-)glanduläre Phase
3. Kanalikuläre Phase
4. Sacculäre Phase

Diese Gliederung läßt sich prinzipiell auf die meisten höheren Tierspezies übertragen, wobei der relative Anteil der einzelnen Phasen variiert (83). Die morphologischen licht- und elektronenmikroskopischen Characteristica dieser Phasen stellen sich wie folgt dar:

Die embryonale Phase umfaßt den Zeitraum von der Ausknospung der paarigen, schon früh asymmetrischen (74) Lungenanlage aus dem Entodermrohr, die Entwicklung der Anlagen der Lungenlappen bis zur weiteren dichotomischen Aufteilung der bronchopulmonalen Segmente, aus denen die späteren Luftwege entstehen. Am Ende dieser Phase wird der primitive Bronchialbaum von einem arteriellen Plexus umsponnen (21). Der Mesenchymanteil ist zu dieser Zeit groß und verringert sich im Verlauf der Tragzeit zugunsten der epithelialen Komponente (16). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß die Mitoserate des Mesenchyms nur halb so groß ist wie die des Epithels (150). Das mehrzeilige Epithel ist noch undifferenziert und hochzylindrisch. Ultrastrukturell sind die Zellen organellenarm, enthalten je-

doch ein ausgeprägtes Golgifeld, reichlich Glycogen und sind durch ein apikales Schlußleistennetz verbunden (29, 140).

Die glanduläre Phase ist charakterisiert durch ein drüsenähnliches Bild im Gewebsschnitt infolge weiterer dichotomischer Teilung der bronchopulmonalen Endknospen. Es entstehen alle nicht-respiratorischen Anteile des Bronchialbaumes (21). Das Epithel wird jetzt zur Peripherie hin einreihig, ist weiterhin hochzylindrisch und durch ein apikales Schlußleistennetz verbunden (16, 34, 140). In großen Bronchien treten vereinzelt zilienbesetzte Zellen auf. Die späteren, peribronchial gelegenen Myoblasten sind durch engen Kontakt zum Bronchus erkennbar.

In der kanalikulären Phase entstehen erstmalig respiratorische Einheiten: diese Acini bestehen nach v. HAYEK (77) beim Menschen aus einem Bronchiolus terminalis mit drei Generationen späterer Bronchioli respiratorii. An diese schließen sich je eine periphere Traube von 6 bis 7 Epithelknospen an, die die späteren Sacculi darstellen. Parallel dazu schreitet die Kapillarisierung bis zum Bronchus respiratorius fort, wobei sich die Gefäße dem Epithel annähern. Der Mesenchymanteil nimmt weiter ab (55). Die Epithelzellen sitzen einer vielfach gefalteten Basalmembran auf. Sie zeigen ausgeprägte Interdigitationen. Das Schlußleistennetz ist in Richtung auf die Basalmembran verschoben, wodurch ein haubenförmiger Zellapex entsteht. Die Zelloberfläche ist durch erste Microvilli strukturiert (29, 140). In den Epithelknospen sind Glycogengehalt und Mitoserate am höchsten.

Der Übergang der kanalikulären in die sacculäre Phase ist durch tiefgreifende Veränderungen gekennzeichnet: gleichzeitig mit einem weitgehenden Verlust des epithelialen Zilienbesatzes und starker Reduktion des Glycogengehaltes ist eine beginnende Differenzierung in Typ-I-Pneumozyten und Typ-II-Pneumozyten zu beobachten (63, 78, 140, 153).
Der Zeitpunkt dieser "kritischen Phase" während der Tragzeit ist abhängig vom Reifestand der Lunge zum Zeitpunkt der Geburt, sodaß beispielsweise das Meerschweinchen als Nestflüchter diese Phase früher durchläuft als das Kaninchen als Nesthocker (9). Zudem finden sich zwischen Multivesikularkörpern und Formationen des Golgi-assoziierten endoplasmatischen Reticulums Übergangsformen zu den Lamellarkörpern (79, 88, 89, 140, 154, 158). Die daneben auftretenden, zunehmend abflachenden Zellen sind als präformierte Typ-I-Pneumozyten frei von Lamellarkörpern und zeigen beginnende pinozytotische Aktivität. Primärsepten und Nischen formieren sich (140).

In der sacculären Phase gehen die bisher vom kubischen Epithel ausgekleideten Knospen in dünnwandige, von einem elastischen Faserring begrenzte Sacculi über. Diese sind untereinander durch kapillarisierte Sporne getrennt. Hier findet später der überwiegende Teil des Gasaustausches statt (77). Das Epithel differenziert sich unter weiterem Glycogenverlust zu reifen, insbesondere über prominenten Kapillarschlingen flach ausgebreiteten Typ-I-Pneumozyten und in den Nischen gelegenen Typ-II-Pneumozyten mit osmiophilen Einschlüssen (21, 140). Diese werden

zunehmend in das Lumen ausgeschleust, und die Anwesenheit der oberflächenaktiven Substanz kann in der alveolar lavage nachgewiesen werden (27, 122). Die zu dieser Zeit beschriebenen unterschiedlichen Entfaltungszustände der vitalen Lunge werden einerseits durch eine aktive Sekretion von Flüssigkeit in die Alveolarhöhle und andererseits durch rhythmische Kontraktionen der glatten Bronchialmuskulatur (20, 55, 141, 152) erklärt, wodurch über eine Sphinkterwirkung ein Rückstau der sezernierten Flüssigkeit in peripheren Lungenabschnitten zustande kommt (84, 164).

Die Verteilung der vier Reifungsphasen auf die Tragzeit verschiedener Tiere und des Menschen läßt sich aus der Tabelle 1 (nach 113 und 96) ablesen.

	Mensch	Kaninchen	Schaf	Ratte	Meerschweinchen
embryonal	26-52				→27
glandulär	53-112	→24	→95	→18	28-35
kanalikulär	112-168	24-26	95-120	19-20	36-45
sacculär	168→	27→	120→	21→	46→
Erstes Surfactant	160	27	120	19	
Tragzeit	266	32	147	20-22	54-72

Tabelle 1: Reifungsphasen der Lunge und Tragzeiten verschiedener Spezies in Tagen

Die von SCHNOY und Mitarbeitern (140) am gleichen Tiermaterial untersuchte Normalreifung führte zu folgender Phaseneinteilung:

17./18. SST	Aussprossung der Lungenanlage
bis zum 34. SST	Embryonale Phase
35.-45. SST	Glanduläre Phase
46.-48. SST	Kanalikuläre Phase
ab 49. SST	Sacculäre Phase

Die Ausreifung des sacculär-alveolären Lungenparenchyms ist zum Zeitpunkt der Geburt nicht vollständig abgeschlossen. Postnatal findet noch eine zentripetal gerichtete Alveolarisation der terminalen Bronchioli statt. Die dichotomische Teilung setzt sich lange nach der Geburt fort (21). Das Meerschweinchen besitzt zum Zeitpunkt der Geburt als Nestflüchter eine weiter ausgereifte Lunge als beispielsweise das Kaninchen als Nesthocker. Die vollständige postnatale Ausreifung nimmt daher beim Meerschweinchen weniger Zeit in Anspruch (81, 159).

B) Anatomie der adulten Lunge

Die reife Meerschweinchenlunge ist in 7 Lappen gegliedert (35, 49, 142). Der rechte Hauptbronchus gibt 3 Lappenbronchien zum kranialen, mittleren und akzessorischen Lungenlappen ab und endet im Kaudallappen. Der linke Hauptbronchus versorgt über zwei abzweigende Lappenbronchien den linken Kranial- und Mittellappen und endet im Kaudallappen. Die weitere Aufgliederung der Bronchialäste geschieht dichotomisch (142) bis zu den terminalen Bronchioli,

die mit zilientragendem kubischen Epithel ausgekleidet sind. Diese sind über LAMBERT-Gänge mit angrenzenden Alveolen verbunden. Der Bronchus terminalis geht beim Meerschweinchen im Unterschied zum Menschen in nur einen Bronchus respiratorius mit kubischer zilienfreier epithelialer Auskleidung über. Die Alveolarlumina kommunizieren mit den Bronchioli respiratorii über einen durch elastische Fasern und glatte Muskulatur verstärkten Alveolarring. Jeder Bronchiolus respiratorius teilt sich in zwei Ductus alveolares unterschiedlicher Länge, aus denen wiederum je zwei Sacculi alveolares mit zirkulär angeordneten Alveolen hervorgehen (145).

Das Epithel in den Alveolen der reifen Lunge besteht zu 40% aus flach ausgebreiteten Typ-I-Pneumozyten und zu 60% aus Typ-II-Pneumozyten. Durch die wesentlich größere Flächenbedeckung des Typ-I-Pneumozyten von ca. 2300 um im Verhältnis zur Fläche eines Typ-II-Pneumozyten von ca. 60 um, werden aber etwa 95 % der Alveolaroberfläche von Typ-I-Pneumozyten bedeckt.

Die Typ-I-Pneumozyten enthalten einen zentral gelegenen Kern und spärliche perinukleär angeordnete zytoplasmatische Organellen (Ribosomen, rauhes endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Feld und wenig Mitochondrien). Die Oberfläche ist glatt. In den Zytoplasmaausläufern finden sich Pinozytosevesikel und nur ganz vereinzelt Organellen. Die kubischen Typ-II-Pneumozyten liegen meist in Nischen. Die lumenseitige Oberfläche ist durch Mikrovilli vergrößert. Das Zytoplasma enthält wesentlich mehr Organellen als das der Typ-I-Pneumozyten. Zudem sind Mitochondrien und Multivesikularkörper größer. Charak-

teristisch für diesen Zelltyp sind die aus 40 bis 50 Å starken Lamellen zusammengesetzten osmiophilen Einschlüsse, die Lamellarkörper (113).

4. Gewebe- und Zellkultur der Lunge

Die Wirksamkeit von Substanzen im Sinne einer Förderung der Lungenreifung ist durch Applikation in den Kreislauf des Muttertieres oder in das Fruchtwasser nur schwer beurteilbar, da Reaktionen und Gegenregulationen des Feten bzw. der Mutter nicht sicher erfaßt werden können. Dagegen bietet die Gewebekultur, bei der die äusseren Bedingungen - wie Nährstoffangebot, Gaszusammensetzung, Temperatur usw. - konstant sind, eine Möglichkeit, die Wirkung der gewählten Substanzen in definierten Konzentrationen zu untersuchen (19). Im folgenden sollen die gebräuchlichsten Methoden der Gewebekultur genannt werden (124).

Objektträger-Deckglaskulturen können mit Plasmagerinnsel, hängendem Mediumtropfen oder zirkulierenden Kulturmedien in einer Perfusionskammer angelegt werden.

Bei der Flaschentechnik nach CARRELL wächst das Gewebe auf einem Gerinnsel, das den Flaschenboden bedeckt. Ähnlich werden Reagenzglaskulturen angelegt. "Roller tubes" sind Kulturgefäße, die ein flüssiges Medium enthalten. Durch ständige Bewegung werden die an der Glaswand haftenden Explantate von dem Medium umspült.

Dreidimensionale Substrate - wie z.B. Gelatine - und insbesondere Celluloseschwämme - gestatten dem

Gewebe ein Wachstum zu Strukturen, die denen in vivo ähnlicher sind als bei den zuvor genannten Verfahren.

Es finden feste Medien - wie Plasmagerinnsel oder Agar - und flüssige Medien Anwendung. Biologische Flüssigkeiten oder Gewebeextrakte sind natürliche Medien und stehen den definierten Medien, den gepufferten Salzlösungen und den teilweise oder vollständig synthetischen Medien gegenüber. Die Gewebezüchtung auf einer ins flüssige Medium tauchenden Vitellinischen Membran (174), Celluloseacetat-Folie (144) oder einem Linsenpapier (165) ermöglicht eine bessere Sauerstoffversorgung, die besonders für adultes Lungengewebe eine entscheidende Rolle für die Haltbarkeit des Explantates spielt. Hierfür ist auch die Größe des Gewebestückes von Wichtigkeit, da sowohl Nährstofftransport als auch Gasaustausch nach Fortfall des Blutflusses durch Diffusion erfolgen müssen. Die Sauerstofflöslichkeit im Medium wie auch im zellfreien Blutplasma ist deutlich geringer als die Sauerstoffbindungskapazität des Hämoglobins der Erythrozyten.

Trotz des relativ geringen Sauerstoffverbrauchs des Lungengewebes (165) berichten viele Autoren über Nekrosen, die im Zentrum des Explantates auftreten (23, 30, 65, 127, 165) und führen diese auf einen Sauerstoffmangel zurück. Durch die Steigerung des Sauerstoffgehaltes im Kulturgefäß auf 95 % (bei 5 % CO_2) konnte TROWELL (165) den maximalen Radius des Gewebsstückes von 0,3 mm auf 0,7 mm erhöhen, ohne daß Nekrosen auftraten. Bei TROWELLs Versuchen traten dabei keine toxischen Sauerstoffwirkungen auf. Dagegen berichtet ein anderer Autor

(129) über das Auftreten von Zellödem, Zellnekrosen und zystischer Dilatation der Bronchioli unter gleich hohen Sauerstoffspannungen.

A) Gewebekultur:
embryonales Lungengewebe

Explantate embryonalen Lungengewebes wurden von verschiedenen Spezies untersucht, so z.B. vom Huhn (4, 23, 39, 40, 68, 69, 70, 84, 103, 104, 110, 111, 114, 136, 160, 166, 172) - von der Ratte (26, 31, 65, 114, 117, 127, 149, 152) - von der Maus (1, 3, 5, 6, 20, 41, 93, 125, 130, 136, 146, 160, 173, 177) - von Kaninchen und Katze (30, 146) und vom Menschen (28, 32, 50, 61, 92, 98, 99, 100, 101, 151, 157).
Dagegen liegen Untersuchungen von Lungenexplantaten vom Meerschweinchen bisher nur vereinzelt vor (43, 135, 149, 152). Diese Untersuchungen decken nicht den gesamten Bereich der Organentwicklung ab. Vor allem fehlen im Schrifttum Studien zur Ultrastruktur der Reifung von Lungengewebe des Meerschweinchens im Explantat.

In der Kultur embryonalen Gewebes wird immer nur ein organotypisches, d.h. organähnliches Wachstum eintreten. Diese Einschränkung muß bei der Interpretation der Ergebnisse grundsätzlich berücksichtigt werden.
Zu den allgemeinen Explantatreaktionen muß die sogenannte "Membran-Reaktion" gezählt werden. Es handelt sich dabei um ein hüllen- oder rasenartiges Auswachsen von epithelialen, häufiger jedoch von mesenchymalen Zellen aus dem explantierten Gewebestück (23, 30, 84, 98, 110, 130, 135, 173). Nach mehrfacher Subkultivierung tritt ein Differenzierungs-

verlust dieser membranartig ausgewachsenen Zellen ein (28). Bei der Membranreaktion epithelialer Zellen wurde über eine fibrinolytische Potenz berichtet, die zur Verflüssigung des fibrinhaltigen Nährmediums führte (30, 98).

a) Der Bronchialbaum im Explantat embryonalen Lungengewebes

Die Kultivierung des Entoderm-Rohres 9-tägiger Mäuseembryonen vor Erscheinen des tracheobronchialen Divertikulums führt zur Aussprossung eines kurzen Tracheastumpfes mit Ausbildung von zwei verschiedenlangen Hauptbronchien, die sich während 4-tägiger Kultur nicht weiter aufteilen (41). Bei Explantation am 11. - 12. Schwangerschaftstag sind die beiden Hauptbronchien bereits im Explantatmaterial ausgebildet und verzweigen sich zunächst monopodisch zu Lappenbronchien (3) und im weiteren Verlauf nur noch dichotomisch (20). Dieser Prozeß geht mit Bildung der Lungenlappen durch interlobuläre Furchung einher, läuft aber im Explantat langsamer als in vivo ab. Zu dem Ergebnis einer zeitlichen Verzögerung kamen auch andere Untersucher (4, 13, 20) bei der Kultivierung von entsprechendem Material aus Hühnerembryonen. Lichtmikroskopisch entspricht nach ALESCIO (3) dagegen die Struktur der in vitro gereiften Lungenanlage der in vivo entstandenen des entsprechenden Alters.

Am 10. Schwangerschaftstag sind bei Rattenembryonen die beiden Hauptbronchien mit drei Aufzweigungen der rechten und zwei Aufzweigungen der linken Seite angelegt (31). Während sechstätiger Kultivierung

dieses Materials mit einer modifizierten Uhrglastechnik im flüssigen Medium teilen sich die Lappenbronchien schnell dichotomisch zu einem dichten Zweigwerk. Dieses zeigt dann im histologischen Schnitt durch dichte Gruppierung sogenannter Pneumonomere um einzelne Bronchiolen ein drüsenähnliches Bild (31). Die dichotomische Teilung der Endknospen beginnt mit einer hammer- oder hantelförmigen Ausstülpung, in deren Bereich die meisten Mitosen anzutreffen sind. An der zukünftigen Bifurkationsstelle findet man die meisten "degenerierenden" Zellen. Diesem Nebeneinander von Mitosen und Arealen degenerierender Zellen kommt eine Bedeutung für die gewebliche Strukturierung der Lunge zu (61).
Bei 4 - 6 Tage alten Hühnerembryonen gehen aus der Lungenanlage in der Kultur Bronchien durch dichotomische Teilung und zystische Erweiterung der Endknospen mit Abflachung de Epithels hervor (84). Dabei differenziert sich das Mesenchym zu glatter Muskulatur und Knorpelzellen.

b) Die Mesenchym-Epithel-Beziehung in der Gewebekultur embryonalen Lungengewebes

Der Einfluß des Mesenchyms auf das Wachstum des epithelialen Zweigwerkes der Lunge wurde in folgender Versuchsanordnung untersucht (5, 125):
Eine in toto kultivierte Lungenanlage von Mäuseembryonen des 11. Schwangerschaftstages diente als Vergleich zu Explantaten des gleichen Schwangerschaftstages, an denen folgende Manipulationen vorgenommen waren:

a) Entfernung des rechten Lungenflügels
b) Entfernung des linken Lungenflügels
c) Entfernung der epithelialen Anteile des rechten Lungenflügels
d) Entfernung der epithelialen Anteile des linken Lungenflügels

Nach alleiniger Entfernung der epithelialen Anteile auf einer Seite ist ein besonders auffällig verstärktes Wachstum auf der Gegensteite zu erkennen, jedoch tritt auch bei kompletter Entfernung eines Lungenflügels unter Erhalt der Epithel-Stroma-Relation des Gesamtplantates bereits eine deutliche kompensatorische Wachstumsbeschleunigung am verbleibenden Lungenflügel auf (5). Auch die Tatsache, daß das Mesenchym während der Tragzeit in Relation zum Epithel an Menge abnimmt und stets direkt um die Pneumonomere am dichtesten angeordnet ist, deutet auf eine enge funktionelle Beziehung der beiden Gewebe hin. Dagegen führt die Wachstumshemmung des Bindegewebes im menschlichen Lungengewebe der glandulären Phase durch 3,4-Benzpyren zur Ausbildung hyperplastischer Bezirke im Bronchialepithel und bei höherer Dosierung zu gesteigerter Proliferation neuer Bronchioli (98,99).

Die Mitoserate des Mesenchyms beträgt nur etwa die Hälfte der des Epithels. Dies führt nach SOROKIN (149, 152) zu einer den Bronchialbaum ausformenden quantitativen Verschiebung der Gewebskomponenten. Voraussetzung für die epitheliale Proliferation und Bronchussprossung ist neben dem Epithel-Mesenchym-Bezug offenbar auch die Verfügbarkeit von Glykogen in den Epithelzellen (6), das als Energiequelle für die mitotische Zellteilung dient (153). So führt die

Transplantation eines Mesenchymstückes von einer Lappenbronchusknospe zur Trachea am Implantatort zur Bildung einer neuen Bronchusknospe (20). Ausserdem wird an dieser Stelle in das hier zu diesem Zeitpunkt (11. SST., Maus) bereits glycogenfreie Epithel erneut Glycogen eingelagert (6).
Nach Behandlung des Gewebes mit Trypsin und Kollagenase kommt es zur vollständigen Dissoziation von Epithel- und Mesenchymzellen. Diese reaggregieren im Explantat zu typischen tubulär-epithelialen und mesenchymalen Strukturen, die bald darauf Funktionen wie Sekretion und Formation von Grundsubstanz übernehmen (68, 69, 133). Vom Mesenchym isolierte Epithelzellen bilden keine differenzierten Gewebestrukturen aus (160), behalten aber einige Tage die Potenz bei, nach Zusatz von Mesenchym im optimalen quantitativen Verhältnis sich erneut zu reorganisieren (70). Der beste Zeitpunkt zur Organisation liegt bei Hühnerembryonen zwischen dem 7. und 12. Bebrütungstag. Dagegen ist offenbar zu späteren Zeitpunkten die Zelldifferenzierung und damit die Gewebekomplexität für eine Reorganisation bereits zu weit fortgeschritten. Die Interaktionen zwischen Mesenchym und Epithel kommen vermutlich durch eine induktiv wirkende Substanz zustande. Diese kann im Experiment über kurze Entfernungen und durch eine zwischen beiden Gewebstypen liegende Vitellinische Membran oder einen Millipore-Filter wirken (39, 40, 160).

Auch heterologes Mesenchym kann - abhängig von seinem topographisch-embryologischen Ursprung - ebenso wie xenoplastisches Mesenchym induktiv auf die bronchiale Morphogenese wirken. So kollaborieren im Experiment beispielsweise Bronchiolen eines Mäuse-

embryos mit Mesenchym von Hühnerembryonen (160, 166), wobei die Mesenchymzellen zum Epithel wandern (173). Die umgekehrte Kombination von Hühnerepithel mit Mäuseenchym führte dagegen nur in eingeschränktem Maße zu typischer Morphogenese (160). WOLFF stellte eine Chimärenbildung zwischen Epithelien von Mäuse- und Hühnerembryonen fest (173).
Trennt man von einem embryonalen Bronchialbäumchen unter Erhaltung seiner Struktur das Mesenchym ab und entfernt es eine kurze Strecke vom Epithel, so setzt eine weitere Teilung der Bronchialzweige erst nach Abschluß der Migration des Mesenchyms zum Epithel und Reaggregation beider Gewebe wieder ein (39).
Neben den beschriebenen Wirkungen des Mesenchyms auf das epitheliale Wachstum scheint es auch in umgekehrter Richtung eine Wirkung der einzelnen Gewebskomponenten aufeinander zu geben. Zur Differenzierung des Lungenmesenchyms in Muskulatur, vaskuläre Elemente und Stromazellen ist die Anwesenheit von Lungen- oderDarmepithel Voraussetzung - Nierenepithel dagegen führt nicht zur Differenzierung in Muskelzellen. Diese Reorganisation und Differenzierung findet auch nach kompletter Dissoziation der Zellen statt - allerdings ist bei Trennung der Epithelien vom Mesenchym durch einen Millipore-Filter keine Differenzierung zu Muskulatur zu beobachten (160).

Dem Nährmedium zugesetztes Hühnerembryonenhomogenat stimuliert nach den Ergebnissen von SAMPAOLO und SAMPAOLO (136) die Morphogenese sowohl homologer als auch heterologer (Mäuse-)Lungen im Explantat. CROISILLE (38) hatte früher von

einer Wachstumshemmung fetalen Lungenmesenchyms bei Kultivierung auf homologem Extrakt berichtet. Embryonales Lungengewebe hat bei gemeinsamer Kultur mit Geweben anderer embryonaler Organe wie Leber, Milz, Schilddrüse und Urniere die Eigenschaft, diese völlig zu überwuchern (23).

c) Ausreifung des Enzymmusters des Epithels

Die histochemische Reifung embryonaler Hühnerlungen in vitro zeigt weitgehende Parallelität mit dem in vivo beobachteten Ablauf. Histochemische und morphologische Differenzierung schreiten in proximo-distaler Richtung fort (151).
Die Succinat-Dehydrogenase kann als Ausdruck der Aktivität des Citrat-Zyklus während der gesamten Lungenreifung nachgewiesen werden. Dagegen ist die Existenz der Glucose-6-Phosphatase in der Lunge weder prä- noch postnatal zu belegen. Dieses Enzym, das aus dem Glykogen-Abbau stammendes Glucose-6-Phosphat dephosphoryliert, wird in der Darmschleimhaut, in der Leber und der Niere nachgewiesen. Durch die Wirkung dieses Enzyms kann Glucose aus dem Gewebe in das Blut zur weiteren Verwendung an anderem Ort im Organismus abgegeben werden. Aus dem Fehlen der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase im Lungengewebe ist mit SOROKIN zu schließen, daß im Lungenepithel vorhandenes Glykogen intrazellulär zur Energiegewinnung - insbesondere für die mitotische Teilung - Verwendung findet.
Die alkalische Phosphatase ist in den Endknospen der fetalen Rattenlunge vorhanden. Beim Meerschweinchen wird sie vom 40. Schwangerschaftstag an in Epithelzellen größerer Bronchien gefunden.

Eine Aktivität der sauren Phosphatase ist nur im Epithel der Bronchien und Bronchiolen feststellbar (150, 151).

d) Morphologische Differenzierung des prospektiven Alveolarepithels

Zur ultrastrukturellen Differenzierung des Alveolarepithels im Explantat liegen - wohl wegen der aufwendigen Technik - wenige Arbeiten vor. Die Vergleichbarkeit dieser Untersuchungen ist durch ihren Stichprobencharakter, die Verschiedenartigkeit der untersuchten Spezies sowie die großen Unterschiede der Explantatdauer stark eingeschränkt. Stückkulturen neuntägiger Hühnerembryonen zeigen nach 4 Tagen Kultur auf einer kontinuierlichen Basalmembran aufsitzende kubische Epithelien. Diese weisen starke Zytoplasma-Interdigitation und Verbindungen durch apikale Zonulae occludentes und wenige Desmosomen auf. Die Zellen enthalten annähernd runde Kerne, . Zytolysosomen, vereinzelte Multivesikularkörper und elektronendichte Granula im Zytoplasma. Der Zellapex ist mit unterschiedlich langen und breiten Mikrovilli besetzt. Die runden bis ovalen Mitochondrien vom Crista-Typ sind gut erhalten. Flach ausgebreitete Zellen werden nicht angetroffen (110, 111).

Lungengewebe 15-tägiger Mäuseembryonen zeigt im Explantat nach einem Monat fast ausschließlich kubische - den Typ-II-Pneumozyten entsprechende - Epithelien mit einer durch Mikrovilli strukturierten Oberfläche. Das Zytoplasma enthält reichlich Lamellarkörper unterschiedlicher Größe und Form. Die Alveolarlumina sind mit osmiophilem lamelliertem

Material und Makrophagen, die auch phagozytiertes lamelliertes Material enthalten, angefüllt. Nach zwei-einhalb Monaten finden sich auf einer kontinuierlichen Basalmembran (175) neben den Typ-II-Pneumozyten nun auch relativ zahlreiche flach ausgebreitete Typ-I-Pneumozyten. Diese sind untereinander durch tight junctions verbunden. Die Lumina enthalten jetzt ausser Lamellarkörpern und osmiophilem amorphem Material auch tubuläre Myelinfiguren. Das Epithel der terminalen Bronchiolen besteht überwiegend aus Flimmerzellen und vereinzelten Clara-Zellen (130).
Lungengewebe 18-tägiger Mäuseembryonen ist bereits in Typ-I-Pneumozyten und Lamellarkörper-enthaltende Typ-II-Pneumozyten differenziert (175). Als Hinweis auf eine ausgeprägte Stoffwechselaktivität weisen die Typ-II-Pneumozyten ein kräftig entwickeltes Golgifeld in einem elektronendichten Zytoplasma auf (175).
Unmittelbar pränatal explantiertes Lungengewebe der Maus besteht nach 9 Wochen Kultur überwiegend aus Typ-II-Pneumozyten. Daneben treten kubische Zellen mit glatter Oberfläche auf, die keine Lamellarkörper enthalten. In den Bronchioli finden sich Flimmerepithel, Clara-Zellen und ein Zelltyp mit Zilienbesatz und lamellierten osmiophilen Einschlüssen (177).

Am 13. Schwangerschaftstag explantiertes Lungengewebe der Ratte befindet sich im embryonalen Stadium der Knospung der Lappenbronchien. Nach vier Tagen differenzieren sich im Bronchusepithel Clara- und Flimmerzellen und in den peripheren Gewebsanteilen Typ-II-Pneumozyten.
Nach 9 Tagen Kultur entsprechen die Explantate rechnerisch geburtsreifem Lungengewebe, bestehen jedoch in den proximalen Luftwegen nur noch aus

Flimmerepithel, in den distalen Bereichen nur aus Typ-II-Pneumozyten (114).
Explantatmaterial vom 15. Schwangerschaftstag enthält kubisches undifferenziertes Epithel. Lichtmikroskopisch entwickelt sich im Explantat zwar eine Weitung der Hohlräume mit Epithelabflachung und Verschmälerung des Mesenchyms, jedoch bleibt die Bildung typischer Septen und Sacculi aus. Zunächst differenzieren sich Lamellarkörper enthaltende kubische Zellen und flache organellenarme Epithelien. Nach 10 Kulturtagen überwiegen schließlich zilientragende und sezernierende Epithelien (117).
Auch von anderen Autoren wird die Differenzierung von Typ-II-Pneumozyten und die Ausschleusung lamellären Materials sowie das Auftreten tubulärer Myelinfiguren in den Lumina in der Kultur embryonaler Rattenlungen beschrieben (1, 65). Mit der zellulären Differenzierung nimmt der Glycogengehalt ab (1, 65, 127). Die Typ-II-Pneumozyten erscheinen nicht immer in flach ausgebreiteter Form, sondern sind meist kubisch und dann nur am Fehlen von lamellären Einschlüssen zu erkennen (1, 127).

Zusammenfassung

Trotz der eingeschränkten Vergleichbarkeit der referierten Ergebnisse lassen sich tendenzielle Gemeinsamkeiten feststellen:

1. Mit zunehmender Explantatdauer differenzieren sich Typ-II-Pneumozyten, bis schließlich das gesamte Alveolarepithel aus diesen Zellen besteht.

2. Bei frühembryonalen Explantaten wird eine Differenzierung zu Typ-I-Pneumozyten nicht beobachtet.

3. Explantate aus der sacculären Phase mit bereits ausdifferenzierten Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten zeigen mit zunehmender Kulturdauer zunächst eine kubische Transformation der Typ-I-Pneumozyten, später ein Vorherrschen von Typ-II-Pneumozyten.

4. Wie auch in der Normalreifung nimmt der Glycogengehalt mit zunehmender Differenzierung des Epithels ab.

B) Gewebekultur:
Reifes Lungengewebe

Bei der Explantation embryonalen Lungengewebes in den verschiedenen Entwicklungsstadien gilt das Interesse des Beobachters den Vorgängen der zellulären und geweblichen Differenzierung und ihrer Beeinflußbarkeit - insbesondere der Acceleration der Epithelreifung. Dagegen ist es Ziel der Kultivierung reifen Lungengewebes, Mechanismen der Steuerung von Zell- und Gewebeleistung sowie ihre Irritation zu studieren. Das Explantat schließt Einflüsse übergeordneter Regulationsmechanismen des Organismus aus. Ein wesentliches Problem liegt bei derartigen Untersuchungen allerdings in der Erhaltung der intakten Organstruktur über längere Zeiträume. Alveolen und Kapillaren kollabieren weitgehend. Das Kapillarendothel zeigt eine degenerative Alteration (30, 43, 156, 157). Die Bindegewebsproliferation transformiert das Explantat zunehmend in ein solides Gewebe (30, 43, 131, 156, 157), in dessen Randbereich ein membranartiges Auswachsen beobachtet wird (30, 97, 131). Lichtmikroskopisch tritt vor allem eine Schwel-

lung, Vakuolisierung, Degeneration und Desquamation des zunehmend granulierten Alveolarepithels auf (30, 127). Vom Explantatzentrum ausgehend entwickelt sich eine an Größe zunehmende Nekrose (30, 50, 156, 157). Zugleich wird eine vermehrte Aktivität ausgewanderter Makrophagen beobachtet (30, 43, 72, 97).
Auch ultrastrukturell fällt am Alveolarepithel eine Schwellung und Abrundung der Typ-I-Pneumozyten auf. Sie werden schrittweise durch Typ-II-Pneumozyten ersetzt (1). Die Lamellarkörpereinschlüsse in den Typ-II-Pneumozyten nehmen an Zahl und Größe zu. Schließlich besteht das gesamte Epithel aus Typ-II-Pneumozyten mit einem reduzierten Microvilli-Besatz (72, 156, 157, 171). Massive Ausschleusung und fehlender Abtransport des osmiophilen lamellären Materials führen zu ihrer Anhäufung in den Lumina (156, 157). Durch Dialyse und Optimierung der Sauerstoffversorgung gelang es GUERRERO (71), die Überlebenszeit des Gewebes auf vier Wochen auszudehnen.

C) Zellkultur

Zur gezielten Untersuchung isolierter Typ-II-Pneumozyten können diese in der Zellkultur u.a. als Monolayer gezüchtet werden. Zur Zelldissoziation gibt es die Möglichkeiten der enzymatischen Digestion (z.B. mit Trypsin und Collagenase), der Inkubation im calciumfreien Medium, wobei die Demosomen aufgebrochen werden, sowie der mechanischen Spaltung der tight junctions (108). Die Separation der Typ-II-Pneumozyten kann mit Zentrifugations-, Sedimentations- und Adhäsionsverfahren erreicht werden (108). Die Typ-II-Pneumozyten können auch als Clone isoliert werden (47).

Die Monolayer-Kulturen behalten ihre Fähigkeit zur Surfactant-Synthese über viele Passagen bei und sind zur Untersuchung biochemischer Vorgänge besonders geeignet. So kann beispielsweise durch Messung der Incorporation radioaktiv markierter Vorstufen der Ablauf bestimmter Syntheseleistungen verfolgt werden (17, 26, 47, 147).
Ultrastrukturell ist ein flach ausgebreitetes Wachstum der Zellen mit engem Kontakt durch zonulae occludentes, maculae adhaerentes und Interdigitation zu beobachten (110, 111). Die Typ-II-Pneumozyten enthalten osmiophile lamelläre Einschlüsse, die mit den in vivo gebildeten Lamellarkörpern morphologisch identisch sind (17, 47).
Die Zellkultur zum Studium embryonalen Gewebes ist unter dem klinischen Aspekt der Lungenreife weniger geeignet, da in diesem Zusammenhang nicht nur die zelluläre, sondern auch die gewebliche Reifung von entscheidender Bedeutung ist.

D) Experimentelle und klinische Ansätze zur Reifeförderung

Im Schrifttum wird einer größeren Zahl verschiedener Substanzen eine reifungsbeschleunigende Wirkung am Lungengewebe zugeschrieben.
Glucocorticoide bewirken physiologische und biochemischen neben morphologischen Veränderungen am Lungengewebe. So sollen nach Glucocorticoidapplikation der potentielle Luftraum durch Abflachung der Alveolarepithelien, Ausdünnung der Septen und verstärkte

"Alveolarisation" vergrößert und die Zahl der Typ-II- Pneumozyten ebenso wie ihr Gehalt an Lamellarkörpern zunehmen (25, 56, 80, 90, 102, 169). Die alveoläre Entfaltbarkeit und Stabilität werden vergrößert und das Auftreten von Surfactant wird vorzeitig beobachtet (15, 25, 56, 74, 80, 90, 94, 169). Im Lungenparenchym und in der alveolar lavage nimmt der Anteil an gesättigtem Phosphatidylcholin zu. Hiermit geht eine vermehrte Incorporation von Cholin und eine gesteigerte Aktivität einiger Enzyme des Phospholipidstoffwechsels einher (15, 25, 56, 74, 80). In der Gewebekultur stimuliert Dexamethason Enzyme, die an der Phospholipidsynthese steuernd beteiligt sind (67). Dabei nimmt der Glycogengehalt in der Zelle ab (1, 50). Cortisol und Hydrocortison fördern den Cholineinbau in gesättigtes Lezithin in den Lamellarkörpern (50, 127), wie auch die Incorporation von Palmitat in Lezithin. Diese stimulierende Wirkung der Glucocorticoide konnte jedoch nur in fetalem Lungengewebe der Ratte nachgewiesen werden, das kurz vor der Geburt explantiert worden war (127, 147).

Den Schilddrüsenhormonen werden ähnliche Wirkungen wie den Glucocorticoiden zugeschrieben (15, 25, 56, 74, 80). Der Thyroxinspiegel im Blut steigt normalerweise vor der Geburt an, ist jedoch bei Kindern mit einem Hyaline-Membranen-Syndrom (HMS) erniedrigt (25, 56, 80).

Thyroxin und Trijodthyronin sind nicht plazentagängig (15). In der Gewebe- und Zellkultur ist eine Acceleration der Reifungsvorgänge am Lungengewebe durch Schilddrüsenhormone nicht einheitlich beobachtet worden (1, 10, 101). Bei Wahl geeigneter Kon-

zentrationen und Explantationszeitpunkte (sacculäre Phase) soll sich jedoch eine gesteigerte Incorporation von Cholin in Phosphatidylcholin beobachten lassen (67).

Dem Pilocarpin wird im Schrifttum in Dosen von einmalig 150 mg/kg Körpergewicht des Feten bzw. täglich 5 mg/kg Körpergewicht des Muttertieres ebenfalls eine reifungsbeschleunigende Wirkung auf die fetale Kaninchenlunge in Form morphologischer Veränderungen und einer Reduktion der Oberflächenspannung zugeschrieben (36, 148). Die reife Lunge der Ratte reagiert nach einmaliger Pilocarpininjektion (150 mg/kg) (62) mit kurzfristiger vermehrter Ausschleusung vorgebildeter Lamellarkörper sowie nachfolgend gehäuftem Auftreten basalständiger Multivesikularkörper und neugebildeter Lamellarkörper. Auch in der Kultur reifen Lungengewebes stimuliert diese Substanz kurzfristig in Konzentrationen von 0,2 µ Mol bzw. 1 µ Mol die Ausschleusung oberflächenaktiven Materials in das Medium (26, 127). Ein gleichartiger Effekt wird durch 1% Acetylcholin (72) beschrieben und konnte von BROWN mit einer Konzentration von 10^{-4} Mol, nicht jedoch von 10^{-5} Mol Acetylcholin (26) bestätigt werden. Ultrastrukturell ist über eine vermehrte LK-Ausschleusung unter Acetylcholingaben aus den Typ-II-Pneumozyten berichtet worden (62). Adrenergische Stimulation fördert nach BROWN (26) die Phosphatidylcholin-Sekretion von Typ-II-Pneumozyten in Monolayerkulturen.

Oestrogen steigert den Acetateinbau besonders in Phosphatidylglycerol und führt zu einem Anstieg intrazytoplasmatischer Lamellarkörpereinschlüsse unter Abnahme des Glycogengehaltes in den Epithelzellen in der Gewebekultur (66).

Daneben hat auch eine erhöhte CO_2-Spannung im Kulturmedium eine vermehrte Incorporation von Glucose in Fettsäuren des Phosphatidylcholins zur Folge (105).

Als weitere die Lungenreifung beeinflussende Substanzen wurden Heroin (56, 60), Prolactin (16), Abkömmlinge des Methylxanthins (74), Oxytocin (56) und c-AMP (56) angesehen.
Die Dekapitation von Kaninchenfeten in utero als Unterbrechung der funktionellen Achse zwischen Hypophyse und Nebennierenrinde führt zu einer Reduktion der Lamellarkörperzahl in den Typ-II-Pneumozyten und zu einer Erhöhung der Oberflächenspannung in den Lufträumen (112). Ein vom Feten auf das Bestehen eines mütterlichen Diabetes mellitus entwickelter Hyperinsulinismus bewirkt eine verminderte Incorporation von Glucose und Palmitat in Lysophosphatidylcholin - eine Vorstufe des Lezithins (116).

E) Problemstellung

Das Meerschweinchen eignet sich als Versuchstier für Studien zur Beeinflußbarkeit der Lungenreifung im besonderen Maße:

1. aufgrund seiner langen Tragzeit und
2. wegen der Möglichkeit, experimentell an diesem Tier ein dem Hyaline-Membranen-Syndrom ähnliches Krankheitsbild zu erzeugen.

Über das Verhalten embryonalen Lungenepithels insbesondere dieses Labortieres im Gewebeexplantat liegen nur sehr wenige Mitteilungen vor. Aus diesem Grund wurde eine ausgedehnte licht- und elektronenmikroskopische Explantatstudie über die gesamte embryonale Lungenentwicklung durchgeführt.

Diese Studie soll Bezugsgrundlage für verschiedene vergleichende in-vitro-Untersuchungen mit möglicherweise reifefördernd wirkenden Substanzen sein.
Die Beobachtung der zeitlichen Diskrepanz zwischen epithelialer und neuraler Reifung regte zudem zu ersten Versuchen der Beeinflußbarkeit der Lungenepithelreifung durch den parasympathischen Neurotransmitter Acetylcholin an.

III. Material und Methoden

1.) Tierversuche

Weiße Albino-Meerschweinchen der Rasse Pirbright White wurden in Großkäfigen zu 10 Tieren mit je einem Bock gehalten. Das Futter bestand aus Altromin-Meerschweinchenalleinfutter und Heu. Dem ad libitum zugänglichen Wasser wurden 2 mg pro Liter Vitamin C zugesetzt. Für die Bestimmung des Konzeptionstages wurden die Tiere täglichen Kontrollen zur Festlegung des Oestrus unterzogen. Als erster Schwangerschaftstag (SST) wurde der dem Konzeptionstag folgende festgelegt. Zwölf Tiere zwischen dem 25. und 58. Trächtigkeitstag wurden in dreitägigen Abständen durch Genickschlag getötet.

2.) Gewebekultur

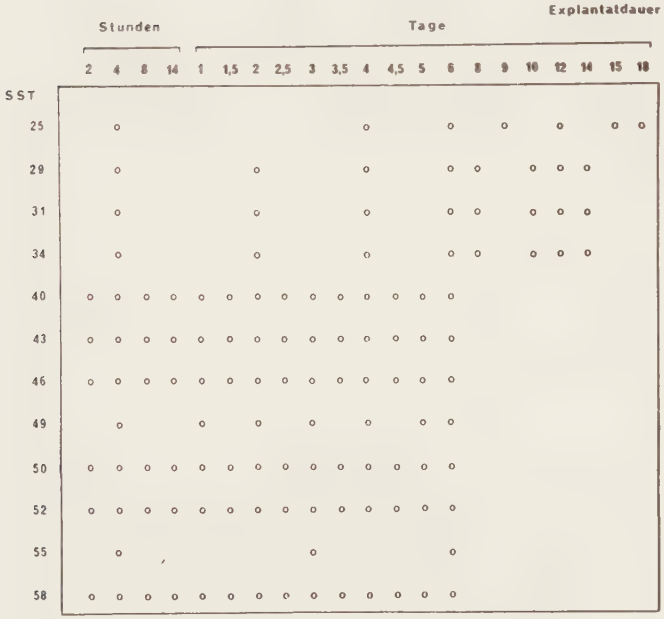
Peripheres fetales Lungengewebe des Unterlappens wurde steril entnommen und mit Skalpellklingen in Würfel unter 1 mm^3 Größe geschnitten. Diese wurden sofort in EAGLE's MEM (minimal essential medium) (48) mit Zusatz von 10% foetalem Kälberserum, Penicillin/Streptomycin und Amphoterizin-B (Firma SERO-MED) bei 37°C verbracht. Nach Ablauf von max. 30 Minuten wurden jeweils ca. 12 Gewebsstücke in die endgültigen Kulturgefäße überführt. Diese Petrischalen (Fa. FALCON) von 6 cm Durchmesser enthielten Organbänkchen (organ culture grid - stainless steel, Fa. FALCON) und 5 ml Nährmedium.

Der Kontakt des Explantates zum Medium wurde durch ein auf dem Grid liegendes Membranfilterstück (SARTORIUS SM 11307) hergestellt - modifiziert nach der von TROWELL (165) angegebenen Methode. Unter gleichen Bedingungen wurden neben dieser Explantatnormalreihe bei den weiteren Materialien von den Schwangerschaftstagen 40 - 43 - 46 - 50 - 55 und 58 Kulturen mit folgenden Zusätzen angesetzt:

a) 10^{-7} g/ml Nährmedium Physostigminsalicylat (Dr. Franz Köhler Chemie).
b) 10^{-7} g/ml Physostigminsalicylat plus 10^{-8} g/ml Acetylcholin (Dispersa Baeshlin).
c) 10^{-7} g/ml Physostigminsalicylat plus 10^{-9} g/ml Acetylcholin.
d) 10^{-7} g/ml Physostigminsalicylat plus 10^{-10} g/ml Acetylcholin.

Die vollständige Hemmung der Acetylcholin-Esterase durch das zugesetzte Physostigmin wurde nach 24 Stunden Kultur sowohl im Medium als auch im homogenisierten Lungengewebe eines ausgewachsenen Tieres fotometrisch überprüft (54).

Die Gaszusammensetzung wurde durch längeres Durchströmen einer Mischung aus 20% O_2, 5% CO_2 und 75% N_2 in einem ca. 10 l fassenden Kunststoffbehälter bei 37°C eingestellt.



Die Gewebeentnahme erfolgte, wie aus Tabelle 2 zu ersehen ist, so, daß ein Raster untereinander vergleichbarer Zeitpunkte der Reifung unterschiedlich lange explantierter Proben entstand.

3.) Morphologische Methoden

Die Fixierung des Gewebes erfolgte in einer Mischung aus 3 Teilen 5%-igem Glutaraldehyd in 1/15 M Phosphatpuffer und 2 Teilen 7,5%-igem Paraformaldehyd bei ph 7,3 und 4^0C über mindestens 12 Stunden. Anschließend erfolgte eine Nachfixierung in 2%-igem OsO_4 über 2 Stunden, Entwässerung und Einbettung in Araldit. Die polimerisierten Blöckchen wurden systematisch mit Glasmessern auf einem REICHARDT-Mikrotom (OMU 3) semidünn geschnitten und mit 1%-igem Toluidinblau angefärbt. Die mit einem Diamantmesser (Du Pont) angefertigen ultradünnen Schnitte wurden mit 5%-igem Uranylacetat in 50%-igem Äthanol und Bleizitrat nach REYNOLDS nachkontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen entstanden an einem ZEISS-Elektronenmikroskop (EM 10).

IV. Ergebnisse

1. Allgemeine Explantatreaktionen

(A) Der Vergleich normalen, nicht explantierten embryonalen Lungengewebes mit 4 Stunden kultiviertem Gewebe zeigt weder licht- noch elektronenmikroskopisch wesentliche Unterschiede, sodaß für die vorliegende Untersuchung das 4 Stunden kultivierte Material als Vergleichsbasis herangezogen wird.

(B) Nekrosen im Explantat treten im gesamten kontrollierten Zeitraum bei Gewebsentnahme zu frühen Entwicklungsstadien - d.h. bis zum 43.

Schwangerschaftstag - nicht auf. Dagegen zeigt Lungengewebe, das nach dem 43. Schwangerschaftstag explantiert wurde, mit zunehmendem uterinen Alter auch ein zunehmend frühes Auftreten zentraler Nekrosen im Explantat, die sich im weiteren Verlauf ausbreiten.

(C) Die präformierten Hohlräume früh explantierten Lungengewebes tendieren zur Größenzunahme.

(D) Je später das Material explantiert wurde, desto mehr rundet sich das Gewebe im Explantat ab und wird von einer bindegewebigen Hülle eingekleidet.

(E) Diese Bindegewebsproliferation tritt bei spät explantiertem Gewebe (in der sacculären Phase) auch im Interstitium auf und führt zur Komprimierung der Lumina.

(F) Der epitheliale Mitose-Index (Mitosen pro 1000 Zellen) unterscheidet sich nach 4 Stunden Kultur nicht von dem der Normalreihe, nimmt aber mit zunehmender Explantatdauer im Vergleich mit dem in utero gereiften Gewebe deutlich schneller ab.

2. Verhalten unterschiedlich weit ausgereiften Lungengewebes im Explantat

Die Abbildung 1 gibt einen Überblick über alle Explantate, deren Beginn - verteilt über die 4 Phasen der embryonalen Lungenentwicklung - als Schwangerschaftstage an der Ordinate abzulesen sind. Zudem sind die Termine, zu denen Gewebe aus der Kultur entnommen wurde, aufgeführt. In dieser Anordnung ist es nicht nur möglich, die Entwicklung jedes einzelnen Explantates für sich - beginnend nach vier Stunden - zu verfolgen, sondern auch von

verschiedenen Ausgangssituationen sich entsprechende Zeitpunkte verschiedener Explantate zu vergleichen.

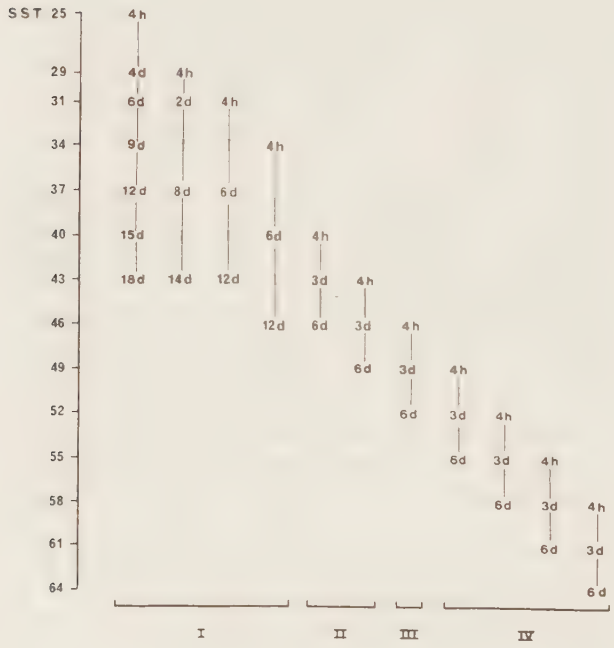


Abb. 1: Übersicht über die durchgeführten Explantate und ihre Zuordnung zu den Lungenreifungsphasen (I. embryonale Phase, II. glanduläre Phase, III. kanalikuläre Phase, IV. sacculäre Phase).

Die Auswertung der licht- und elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte unter Berücksichtigung folgender Kriterien:

- Epithelhöhe
- Oberflächenstruktur
- Glycogengehalt
- Bildung und Ausschleusung von Lamellarkörpern
- Mitose-Index

Zunächst soll jeweils stellvertretend für eine Lungenreifungsphase die Individualentwicklung der in Abb. 2 gekennzeichneten Explantate beschrieben werden.

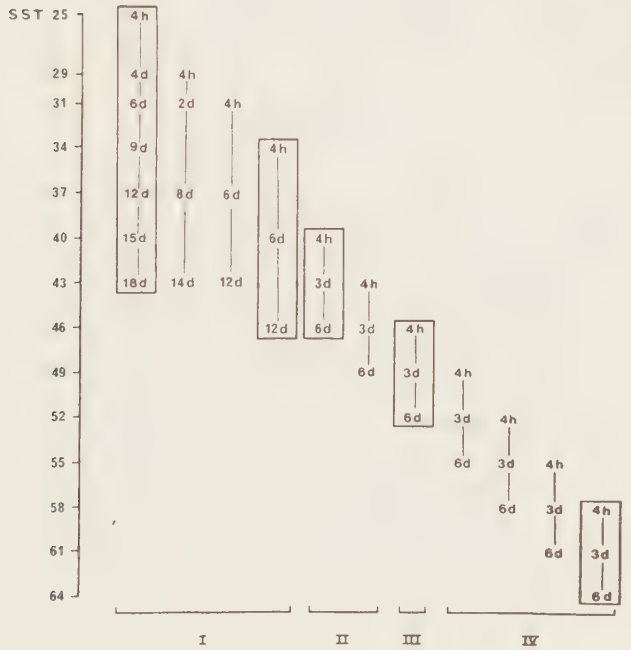


Abb. 2: Erläuterung siehe Text (I. - IV. wie in Abb. 1, S. 44)

(A) Am Ende der embryonalen Phase - am 34. Schwangerschaftstag - explantiertes Gewebe zeigt im Semidünnschnitt nach 4 Stunden Kultur einen mehrfach verzweigten primitiven Bronchialbaum und wenige glycogenreiche epitheliale Endknospen, eingebettet in reichlich lockeres Mesenchym. Elektronenmikroskopisch (Abb.5) finden sich hochzylindrische undifferenzierte Epithelien mit großen runden bis ovalen Kernen und überwiegend basal gelegenen ausgedehnten Glycogendepots im Zytoplasma. Das Zytoplasma ist insgesamt organellenarm, enthält aber neben einigen Mitochondrien und spärlichem rauhem endoplasmatischen Reticulum vielfach schon ein kräftig ausgebildetes Golgi-Feld. Die lumenseitige Oberfläche des Epithelverbandes ist glatt begrenzt. Mikrovilli fehlen. Es findet sich ein hochsitzendes Schlußleistennetz. Die Interzellularräume sind gelegentlich erweitert. Die Zellen sitzen einer zarten Basalmembran auf.

Nach 6 Tagen Kultur ist lichtmikroskopisch kein Fortschritt in der geweblichen Reife zu erkennen, allerdings zeigen die vorher runden Epithelschläuche eine unregelmässige Ausbuchtung. Ultrastrukturell sind im noch zylindrischen, glycogenreichen Epithel neben einigen Golgi-assoziierten Multivesikularkörpern konzentrisch, häufig auch multizentrisch lamellierte Einschlüsse zu finden. Die apikale Zelloberfläche ist nun durch angedeutete Mikrovilli strukturiert, und ein in Richtung auf die Basalmembran versetztes Schlußleistennetz bewirkt eine haubenförmige Vorwölbung des Zellapex in das Lumen.

12 Tage explantiertes Gewebe zeigt lichtmikroskopisch teilweise die Strukturen der kanalikulären Phase mit angedeuteten Septen und Nischen. Teilweise sind die Lumina entfaltet. Das Mesenchym ist in Relation zum Epithelgewebe stark vermindert.
Ultrastrukturell findet sich im nunmehr kubischen Epithel noch reichlich Glycogen. Alle Zellen enthalten sowohl basal als auch apikal ausgereifte Lamellarkörper. Unreife Vorstufen sowohl aus Multivesikularkörpern als auch aus homogenen Einschlüssen hervorgehend, sind an der Zellbasis zu beobachten. Das Zytoplasma enthält weiterhin wenig endoplasmatisches Reticulum und ein ausgeprägtes Golgi-Feld. Die Mitochondrien sind überwiegend im Zellapex angeordnet (Abb. 6).

(B) In der Mitte der glandulären Phase - am 40. Schwangerschaftstag - bietet sich lichtmikroskopisch in der Ausgangssituation nach 4 Stunden Kultur folgendes Bild: im Mesenchym liegen dicht nebeneinander Anschnitte rosettenartiger glycogenreicher Endknospen, die das drüsenartige Bild prägen. Das Mengenverhältnis Bindegewebe : Epithel ist im Vergleich zur embryonalen Phase deutlich zugunsten des Epithels verschoben. Die Lumina sind überwiegend eng.
Elektronenmikroskopisch zeigen die zylindrischen bis kubischen, noch undifferenzierten Zellverbände des in der Peripherie einschichtigen Epithels ein apikales Schlußleistennetz mit flachem Zellapex ohne Microvillisaum (Abb. 7). Das Zytoplasma ist glycogenreich und organellenarm - ähnlich dem Befund in der embryonalen Phase -, enthält jedoch vereinzelt homogene und häufiger multivesikuläre Einschlüsse. Die Basalmembran verläuft ebenso wie die Interzellularspalten geradlinig.

Nach 3 Tagen Kultur haben sich die Lumina geweitet und erscheinen im Anschnitt gebuchtet. Drüsenendstückähnliche runde Epithelknospen mit eröffnetem Lumen sind nur noch vereinzelt zu finden.

Ultrastrukturell ist die Oberfläche - bedingt durch ein apikales Schlußleistennetz und das Fehlen eines Mikrovilli-Besatzes - wenig strukturiert. Im zylindrischen bis kubischen glycogenreichen Epithel sind einige Multivesikularkörper und homogene Einschlüsse - z.T. mit beginnender Lamellierung - zu erkennen.

6 Tage kultiviertes Gewebe bietet im Semidünnschnitt ein Bild ähnlich dem der kanalikulären Phase: der Mesenchymanteil hat zugunsten der Epithelkomponente deutlich abgenommen. Die Epithelschläuche sind durch angedeutete Septen und Nischen stark ausgebuchtet.
Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen in Nischen gelegene, kubische, glycogenreiche Epithelzellen mit Lamellarkörper-Vorstufen mit homogenem Anteil und teils großen, zart lamellierten, reifen Formen. Der mit kurzen Microvilli besetzte Zellapex ist haubenartig ins Lumen vorgewölbt. Das Lumen enthält aus den Zellen ausgeschleuste Lamellarkörper. Die kurzen septenartigen Sprosse dagegen sind mit flacherem Epithel bedeckt, das einer geschlängelten Basalmembran aufsitzt. Das Zytoplasma ist weniger elektronendicht. Der Glycogengehalt ist reduziert. Vereinzelt finden sich Multivesikularkörper (Abb. 8).

(C) In der kanalikulären Phase - am 46. Schwangerschaftstag - explantiertes Gewebe zeigt nach 4 Stunden Kultur überwiegend geschlossene Endknospen, die

einen hohen Glycogengehalt aufweisen. An längs geschnitteten, geweiteten Bronchiolen sind nischenartige Einbuchtungen zu erkennen. Die Kapillarisierung erscheint ausgeprägter, als bei Explantaten früherer Schwangerschaftstage.
Ultrastrukturell zeigen die zylindrischen bis kubischen Epithelzellen der Endknospen einen großen Glycogenreichtum und wenig Organellen. Basal finden sich neben Multivesikularkörpern vereinzelt lamelläre Einschlüsse. Die lumenseitige Zelloberfläche ist durch kurze Microvilli vergrößert. Das die größeren Lumina auskleidende hochzylindrische Epithel ist ärmer an Glycogen und zeigt deutliche Haubenbildung (Abb.9)

3 Tage kultiviertes Gewebe zeigt lichtmikroskopisch in der geweblichen Reife Merkmale der sacculären Phase: neben Anschnitten von Endknospen finden sich Lumina, die durch Septen und Nischen gegliedert sind. Der Mesenchymanteil hat abgenommen. Die Anordnung der Kapillaren in der Mitte der Mesenchymbrücken hat sich nicht verändert, und septale Kapillaren fehlen.
Im elektronenmikroskopischen Bild zeigen alle Epithelien neben reichlich Glycogen grob lamellierte Einschlüsse und Vorstufen mit homogenen Anteilen sowie dünnen Lamellen in wechselnder Zahl. Ins Lumen ausgeschleustes lamelläres Material ist bereits vereinzelt zu beobachten. Microvilli sind bei einem Teil der Zellen deutlich erkennbar. Die Schlußleisten verbinden die meisten kubischen Zellen auf halber Höhe, so daß am Zellapex ausgeprägte Hauben entstehen. Interdigitationen zwischen den Epithelzellen sind ebenso wie deutliche Auffaltungen der Basalmembran erkennbar. Einige Zellen sind stärker abgeflacht und zeigen ein helleres Zytoplasma.

Nach 6 Tagen Kultur ist eine zentrale Nekrose ausgebildet. Im gut erhaltenen Randbereich finden sich im Semidünnschnitt durch proliferiertes Bindegewebe komprimierte, teilweise mit granulären Massen ausgefüllte Lumina. Das Mesenchym zeigt herdförmig Nekrosen. Dagegen erkennt man in anderen Bereichen eine Proliferation des Bindegewebes. Kapillaren sind nicht zu erkennen. Das Gewebestück wird von einer bindegewebigen Membran umsäumt. Ultrastrukturell enthalten alle Epithelien reife Lamellarkörper, teilweise auch multizentrische Riesenformen, die ausgeschleust und in großen Massen im Lumen angehäuft werden. Die Zelloberfläche ist jetzt regelmässig durch stark ausgeprägte Microvilli vergrößert. Glycogen findet sich im Zytoplasma nur noch äusserst spärlich und gelegentlich eingeschlossen in Lamellarkörperkonglomerate. Die Zellen sind untereinander und mit der Basalmembran stark verzahnt (Abb. 10).

(D) Am 58. Schwangerschaftstag - während der saccu-lären Phase - explantiertes Gewebe enthält nach 4 Stunden Kultur bereits in Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten differenziertes, nahezu glycogenfreies Epithel. In den Lumina liegt ausgeschleustes lamelläres Material. Die fortgeschrittene gewebliche Reife ist an der Ausbildung dünnwandiger, durch kapillarisierte Septen voneinander getrennter Sacculi zu erkennen. Die Kapillaren sind dicht unter das Epithel verlagert, so daß die zukünftige Gasdiffusionsstrecke verkürzt ist. Der Bindegewebsanteil ist weiter zurückgegangen.

Ultrastrukturelle Bilder zeigen, daß die über den kapillarisierten Spornen flach ausgebreiteten Typ-I-Pneumozyten im organellenarmen Zytoplasma Pinozytosevesikel enthalten und eine kaum strukturierte

Oberfläche aufweisen. Daneben finden sich vereinzelt in Nischen mit reichlich Microvilli besetzte Typ-II-Pneumozyten. Ihr dunkleres Zytoplasma enthält reife Lamellarkörper, viele - meist apikal gelegene - Mitochondrien, rauhes endoplasmatisches Reticulum, freie Ribosomen, vereinzelt Multivesikularkörper und Golgi-Felder. Das Schlußleistennetz ist weit in Richtung auf die stark aufgefaltete Basalmembran verschoben (Abb. 11).

3 Tage nach der Explantation ist lichtmikroskopisch die sacculäre Struktur zwar erhalten, jedoch erscheinen die Septen durch eine Schwellung der Epithelien verbreitert, und die Lumina sind weniger weit entfaltet. Im Zentrum finden sich nekrotische Areale.
Ultrastrukturell fällt eine Schwellung der Typ-I-Pneumozyten und stark ausgeprägte Oberflächenvergrößerung durch Abschnürung von Zytoplasmakompartimenten auf. Einige Typ-I-Pneumozyten zeigen eine beginnende Ablösung von der Basalmembran.
Gelegentlich finden sich im Zytoplasma Multivesikularkörper. In den Typ-II-Pneumozyten können neben reifen Formen auch basal gelegene Vorstufen von Lamellarkörpern beobachtet werden. Im Lumen findet sich reichlich osmiophiles lamelliertes Material.

6 Tage Kultivierung des Lungengewebes führt zu folgendem Bild: das Gewebestück erscheint abgerundet, bis auf wenige entfaltete Lumina kompakt und wenig strukturiert. Dies ist auf eine Proliferation des Bindegewebes sowohl zwischen den von Epithel ausgekleideten Hohlräumen als auch in Form einer das Stück einschließenden Membran zurückzuführen.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen stark hydropisch geschwollene Typ-I-Pneumozyten, die sich teilweise ablösen oder völlig desquamiert im Lumen liegen. Oft finden sich in den wegen ihrer flach ausgebreiteten Konfiguration noch als Typ-I-Pneumozyten anzusprechenden Epithelien jetzt auch Lamellarkörper wie in den Typ-II-Pneumozyten. Die Typ-II-Pneumozyten sind deutlich in der Überzahl und enthalten reife Lamellarkörper neben Vorstufen und Riesenformen. Die lamellären Einschlüsse werden in großer Zahl ausgeschleust und füllen teilweise die komprimierten Lumina vollständig aus (Abb. 12).

Bei der systematischen Untersuchung der Schwangerschaftstage 34 - 58 fiel die stark beschleunigte und zeitlich vorgezogene Bildung und Ausschleusung der Lamellarkörper auf. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage nach dem frühesten Zeitpunkt, von dem an im Explantat die Entwicklung von undifferenziertem Epithel zu Zellen mit der Syntheseleistung reifer Typ-II-Pneumozyten beobachtet werden kann.

Die zur Klärung dieser Frage an den Schwangerschaftstagen 31, 29 und 25 begonnenen Explantate führten nach 8, 10, bzw. 12 Kulturtagen wiederum zur Bildung lamellärer Einschlüsse (Abb. 13 bis 15), die als reife Lamellarkörper angesprochen werden können. Im Gewebe des Explantates vom 25. Schwangerschaftstag sind nach 4 Stunden Kultur bereits dünne Lamellenbündel - z.T. in konzentrischer Anordnung - im Glycogen undifferenzierter hochzylindrischer Epithelzellen zu finden. Nach 4 Tagen

haben sich multizentrisch feinlamellierte Einschlußkörper entwickelt. Nach 9 Tagen hat die Zahl der Lamellen zugenommen, und nach 12 Tagen sind reife Lamellarkörper vorhanden.

Gewebe des 29. Schwangerschaftstages zeigt ebenfalls nach 4 Stunden - deutlicher jedoch nach 2 Tagen - Kultivierung lamelläre Einschlüsse im Glycogen des undifferenzierten Epithels. Die Lamellierung nimmt auch hier mit der Explantatdauer zu, und nach 10 Tagen können reife Lamellarkörper identifiziert werden.

Auch am 31. Schwangerschaftstag explantiertes Gewebe zeigt nach 4 Stunden Kultur lamelläre Einschlüsse. Nach 6 Tagen sind Multivesikularkörper und Lamellarkörpervorstufen zu finden. Nach 8 Tagen Kultur liegen reife Lamellarkörper vor. Diese frühfetalen lamellären Einschlüsse sind dagegen im peripheren Lungengewebe des 34. Schwangerschaftstages nach 4 Stunden Kultur nicht mehr zu finden. Die Explantation von Lungengewebe noch früherer Entwicklungstage ist durch die geringe Organgröße zu diesem Zeitpunkt limitiert.
Das Auftreten erster Vorstufen sowie die Ausschleusung reifer Lamellarkörper aus den Zellen wird in Abb. 3 in Abhängigkeit vom Schwangerschaftstag und der Explantationsdauer dargestellt. Für beide Parameter ergibt sich ein steilerer Verlauf der Kurve als bei der Normalentwicklung und somit eine Beschleunigung der Reifung im Explantat.

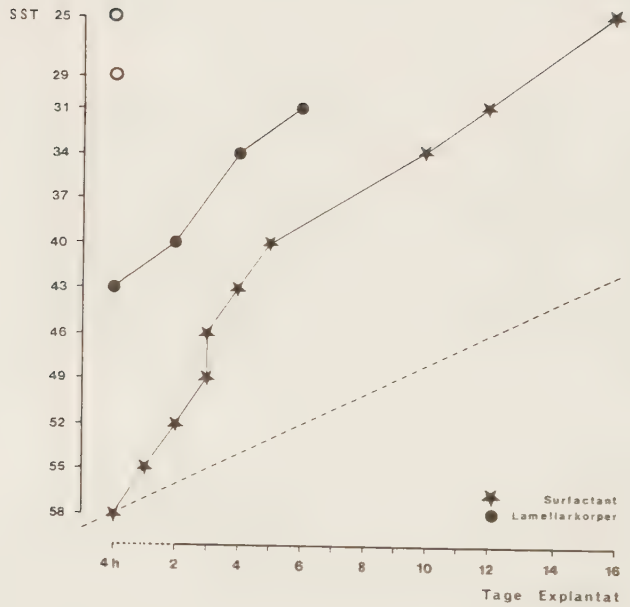


Abb. 3: Auftreten erster Vorstufen und Ausschleusung reifer Lamellarkörper in Abhängigkeit von Schwangerschaftstag und Explantationsdauer.

3. Vergleich des Reifestandes gleichalter Gewebsproben nach unterschiedlicher Kulturdauer

Der Vergleich sich entsprechender Zeitpunkte verschiedener Explantate (in Abb. 4 in horizontaler Ebene) führte zu folgenden Ergebnissen:

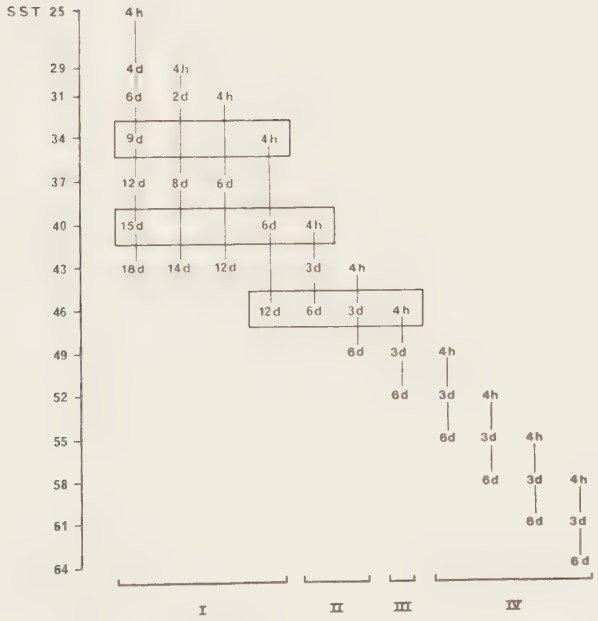


Abb. 4: Erläuterung siehe Text (I. IV. wie in Abb. 1, S. 44)

(A) 4 Stunden kultiviertes Gewebe des 46. Schwangerschaftstages zeigt ein hohes glycogenreiches Epithel mit hochangesetztem Schlußleistennetz (Abb. 9). Vereinzelt finden sich basal gelegene lamelläre Vorstufen zusammen mit Multivesikularkörpern.

Der entsprechende Zeitpunkt nach dreitägiger Explantatdauer (Ausgangsmaterial vom 43. Schwangerschaftstag) zeigt eine stärkere Entfaltung der Lumina, die zudem in Anschnitte gebuchteter, epithelial ausgekleideter Hohlräume übergehen. Der Anteil des Mesenchyms ist vergleichsweise geringer. Ultrastrukturell zeigt sich eine beginnende Haubenbildung der noch glycogenreichen Zylinderepithelien. Die Ausreifung der noch basalständigen Lamellarkörper ist weiter fortgeschritten als in dem Material vom 46. Schwangerschaftstag.

Nach 6 Tagen Kultur bietet ein am 40. Schwangerschaftstag explantiertes Gewebe lichtmikroskopisch eine der kanalikulären Phase ähnliche Struktur mit entfalteten, gebuchteten Lumina und angedeuteten Septen und Nischen. Elektronenmikroskopisch sind voll ausgereifte, apikal gelegene Lamallarkörper zu finden. Der Glycogengehalt ist deutlich geringer als im Material vom 46. und 43. Schwangerschaftstag. Das Epithel über den Mesenchymspornen ist abgeflacht (Abb. 8).

Nach 12 Tagen Explantation eines Gewebes vom 34. Schwangerschaftstag ist eine der kanalikukären Phase ähnliche Struktur mit angedeuteten Septen und Nischen erkennbar. Die massenhaft gebildeten

Lamellarkörper werden vereinzelt ins Lumen ausgeschleust. Die Zellen enthalten allerdings noch reichlich Glycogen und die Oberflächenstruktur ist nur durch wenige kurze Microvilli strukturiert (Abb.6).

(B) Während nach 4 Stunden Kultur in einem Gewebe vom 40. Schwangerschaftstag nur vereinzelt homogene Einschlüsse und Multivesikularkörper im glycogenreichen Epithel zu finden sind (Abb. 7), fallen zum entsprechenden Zeitpunkt nach 6 Tagen Kultur reife Lamellarkörper mit noch zarter Lamellierung auf. Nach 15 Tagen Kultur eines am 25. Schwangerschaftstag entnommenen Gewebes sind viele reife groblamelläre Einschlüsse im deutlich Glycogenverarmten Zytoplasma zu erkennen (Abb. 16).

(C) Vergleicht man 4 Stunden kultiviertes Gewebe des 34. Schwangerschaftstages, das noch keine lamellären Einschlüsse enthält, mit dem entsprechenden über 9 Tage kultivierten Gewebe vom 25. Schwangerschaftstag, so fallen in letzterem größere Aggregate aus lamellären und vesikulären Strukturen auf (Abb.17). Damit ist belegt, daß im Explantat einerseits die Bildung und Ausschleusung der Lamellarkörper als spezifische Leistung der Typ-II-Pneumozyten und andererseits die gewebliche Reifung in Form der Ausbildung von Nischen und Mesenchymspornen beschleunigt ablaufen.

4. Reifung der Lamellarkörper: Vorstufen, Entwicklungsweg, abnorme Formen

Die Reifung der Lamellarkörper aus ihren Vorstufen läßt sich anhand zahlreicher Übergangsformen beobachten. Es können drei verschiedene Entstehungswege angenommen werden:

Hervorgehen aus -1- multivesikulären (Abb. 19) oder -2- homogenen (Abb. 20) Zytoplasmaeinschlüssen sowie -3- als Bildung freier, sich zunehmend aggregierender Lamellen im Zytoplasma (Abb. 21). Am häufigsten kann das Entstehen aus Multivesikularkörpern beobachtet werden, während eine Bildung freier Lamellen im Zytoplasma nur vereinzelt angetroffen wird.

Die unreifen Lamellarkörperformen treten meist basal in der Zelle auf und wandern mit fortschreitender Ausreifung und Größenzunahme zur lumenseitigen Zelloberfläche, an der sie durch Exozytose ausgeschleust werden (Abb. 18). Neben diesen der Normalreifung entsprechenden Vorgängen wird bei spät explantiertem Lungengewebe eine exzessive Lamellarkörperbildung und Ausschleusung mit Bildung von Riesenlamellarkörperformen und exzessiver Exocytose lamellären osmiophilen Materials in das Lumen beobachtet (Abb. 22).

5. Einfluss des Acetylcholin-Zusatzes im Kulturmedium

Der Zusatz von Physostigmin und Acetylcholin in den gewählten Konzentrationen führte weder licht- noch elektronenmikroskopisch zu sicheren morphologischen Abweichungen von den Befunden der Explantatreihe, die ohne weitere Zusätze kultiviert worden war. Insbesondere war keine Beschleunigung der Reifung oder Ausschleusung lamellärer Einschlüsse in Typ-II-Pneumozyten oder geweblicher Strukturierung zu beobachten.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

- Im Explantat embryonalen Lungengewebes sind eine zelluläre Reifung und gewebliche Differenzierung - ähnlich der in utero - zu beobachten.

- Diese Vorgänge laufen in Bezug auf das Geschehen in utero beschleunigt ab.

- Früh explantiertes Gewebe der embryonalen und frühen glandulären Phase zeigt eine Differenzierung des Epithels zu Typ-II-Pneumozyten.

- Während der späten glandulären Phase entnommenes Gewebe differenziert sich in der Kultur zu Typ-I-Pneumozyten, die über Mesenchymspornen flach ausgebreitet sind und zu Typ-II-Pneumozyten, die meist in Nischen liegen.

- Während der kanalikulären Phase explantiertes Gewebe zeigt in der Kultur vorübergehend flach ausgebreitete Typ-I-Pneumozyten an der Oberfläche von Septen und Spornen neben in Nischen gelegenen Typ-II-Pneumozyten.
  Es treten dann aber zunehmend Lamellarkörper in allen Epithelzellen sowie Riesenformen von Lamellarkörpern auf. Die Ausschleusung von Lamellarkörpern und die Ansammlung osmiophilen lamellären Materials in den Lumina sind exzessiv gesteigert.

- Nach abgeschlossener Differenzierung in Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten explantiertes Gewebe läßt eine Zytoplasmaschwellung, Desquamation und kubische Epitheltransformation der Typ-I-Pneumozyten erkennen. Diese Zellen bilden letztlich nach weiterer Kultivierung ebenfalls Lamellarkörper im Zytoplasma, sodaß schließlich fast ausschließlich von Typ-II-Pneumozyten ausgekleidete Sacculi vorliegen. In den Typ-II-Pneumozyten sind Riesenlamellarkörper anzutreffen. Die massive Produktion von Lamellarkörpern und der fehlende Abtransport führen zur Anhäufung lamellären Materials in den vorgebildeten Lumina.

- Die Lamellarkörperbildung scheint aus verschiedenen Vorstufen möglich zu sein.

- Mit der zellulären Differenzierung ist ein Glycogenverlust verbunden.

- Unspezifische Explantatreaktionen wie Nekrosen, Bindegewebsproliferation und Abnahme des Mitose-Index im Vergleich zur Normalreihe werden beobachtet.

- Acetylcholin und Physostigmin zeigen in der gewählten Konzentration keinen Einfluß auf die Reifung des Gewebes im Explantat.

Abb. 5:
34. SST + 4 Stunden Explantat. Hochzylindrisches, undifferenziertes Epithel; glycogenreiches, organellenarmes Zytoplasma; hochangesetzes Schlußleistennetz, [illegible]

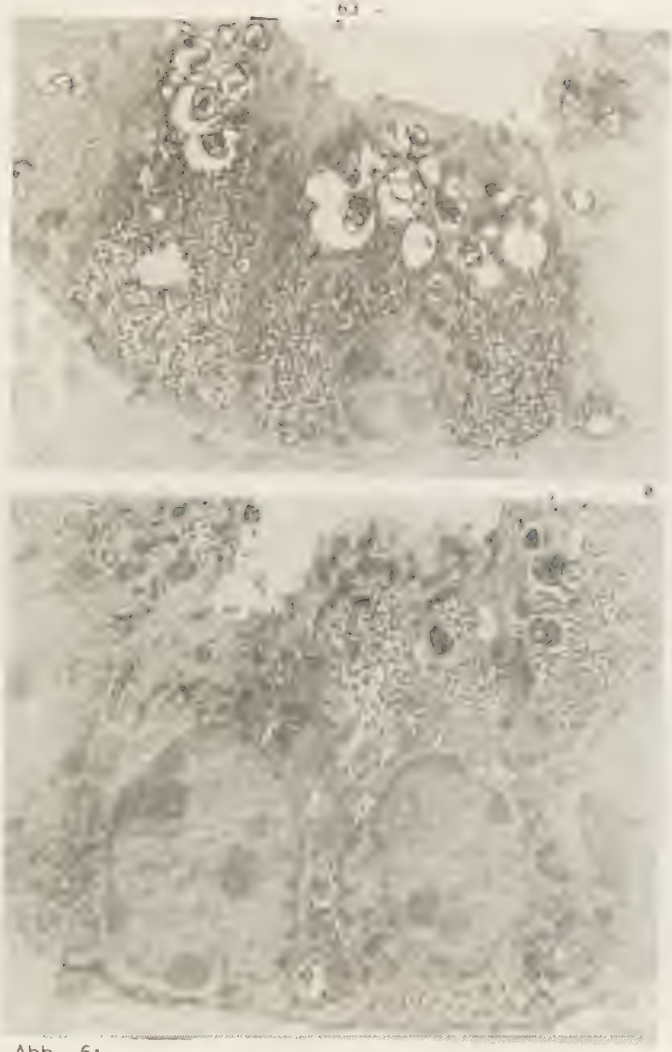


Abb. 6: b

34. SST + 12 Tage Explantat. Kubisches Epithel, reichlich Glycogen, ausgereifte Lamellarkörper, basal gelegene Vorstufen aus Multivesikularkörpern und homogenen Einschlüssen. Hochangesetztes Schlußleistennetz, einige Microvilli, leichte Haubenbildung. a) 8 000 x, b) 6 500 x

Abb. 7:

40. SST + 4 Stunden Explantat. Kubisches Epithel mit apikalem Schlußleistennetz, flachem Zellapex ohne Microvilli. Glycogenreiches, organellenarmes Zytoplasma. Vereinzelt multivesikuläre Einschlüsse. 12 800 x

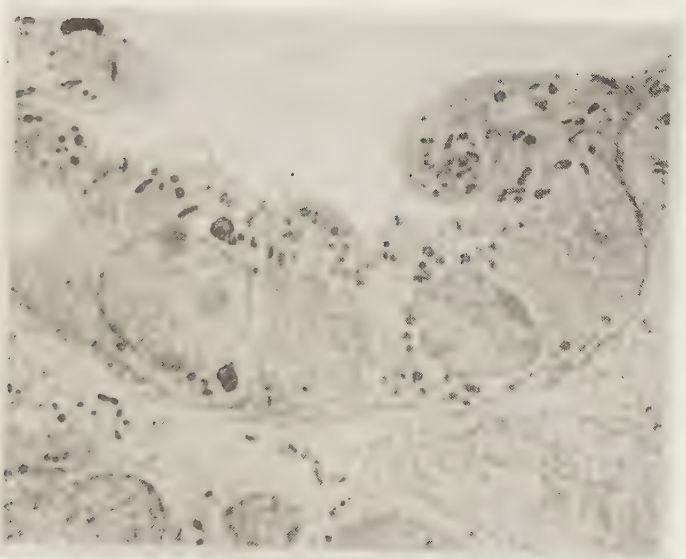


Abb. 8:
40. SST + 6 Tage Explantat. Nischen mit kubischen, glycogenreichen Epithelien, die reife Lamellarkörper und deren Vorstufen enthalten. Haubenartiger Zellapex mit kurzen Microvilli. Kurze, septenartige Sprosse unter flacherem Epithel. 4 500 x

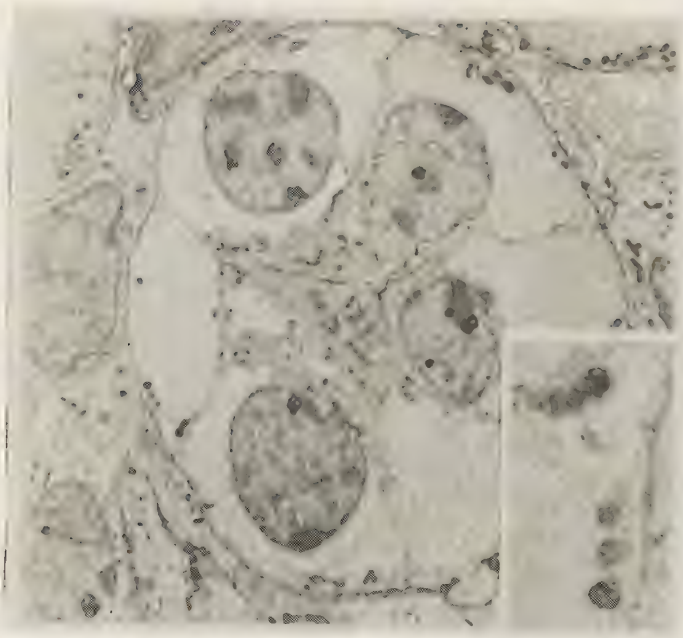


Abb. 9:
46. SST + 4 Stunden Explantat. Kubisches Epithel einer noch glycogenreichen Endknospe. Basal Multivesikularkörper und vereinzelt lamelläre Einschlüsse. Apikaler Saum aus kurzen Microvilli. 3 750 x, Inset: 16 000 x

Abb. 10:
46. SST + 6 Tage Explantat: reife Lamellarkörper in allen Epithelien sowie Riesenformen im Zytoplasma und exzessiv ausgeschleustes lamelläres Material im Lumen. Spärlicher Glycogengehalt, ausgeprägter Microvillisaum, Haubenbildung. 4 000 x

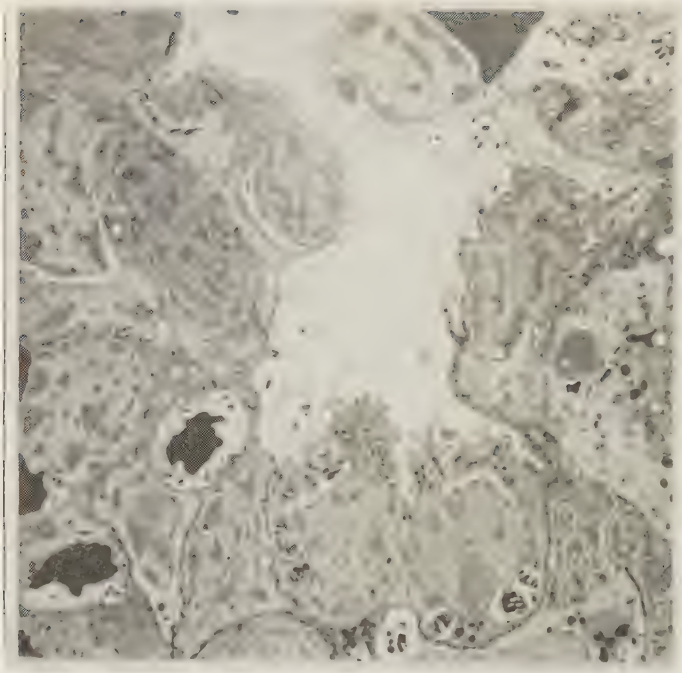


Abb. 11:
58. SST + 4 Stunden Explantat. Differenzierte Typ-I-Pneumozyten über kapillarisierten Spornen und Typ-II-Pneumozyten in Nischen. Weit in Richtung auf die stark gefaltete Basalmembran verschobenes Schlußleistennetz. 4 500 x

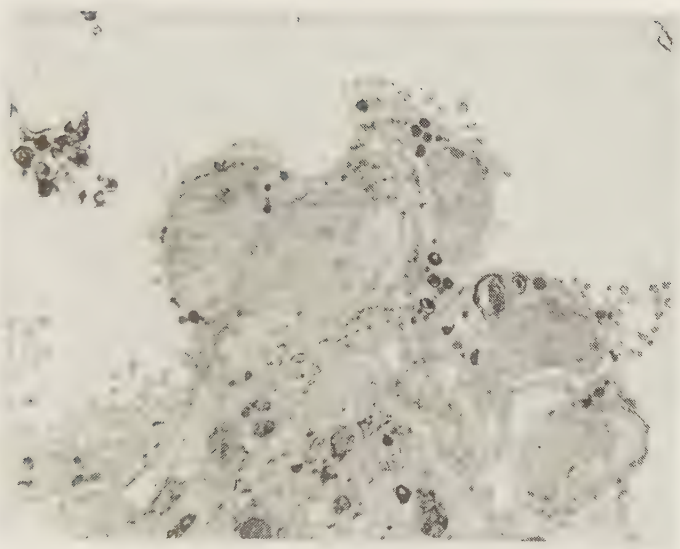


Abb. 12:
58. SST + 6 Tage Explantat. Hydropisch geschwollene Typ-I-Pneumozyten, die sich teilweise ablösen und jetzt vereinzelt Lamellarkörper enthalten. Typ-II-Pneumozyten mit reifen Lamellarkörpern und Riesenformen. Gesteigerte Ausschleusung und Ansammlung lamellären Materials im Lumen. 4 250 x

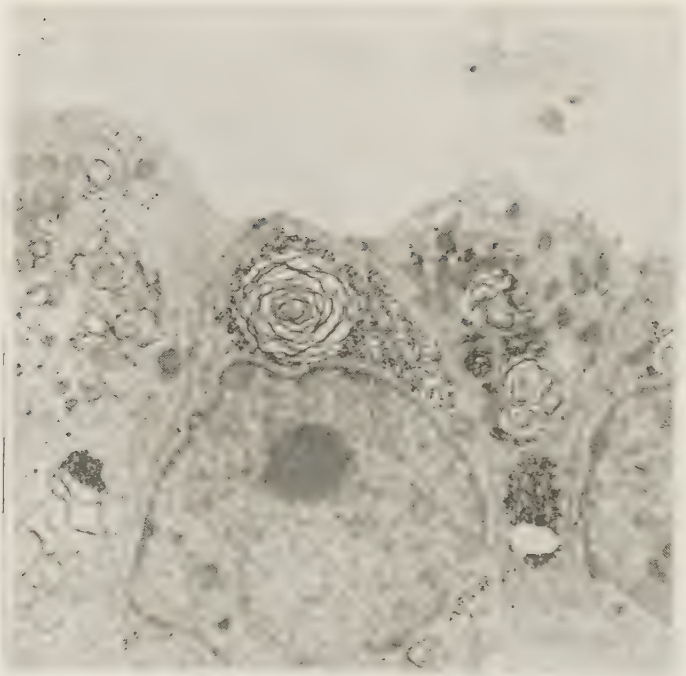


Abb. 13:
31. SST + 8 Tage Explantat. Glycogenreiches Epithel mit leichter Haubenbildung und ausgedehnten Microvilli. Reife Lamellarkörper und Vorstufen. Ausgeschleustes lamelläres Material im Lumen. 10 700 x

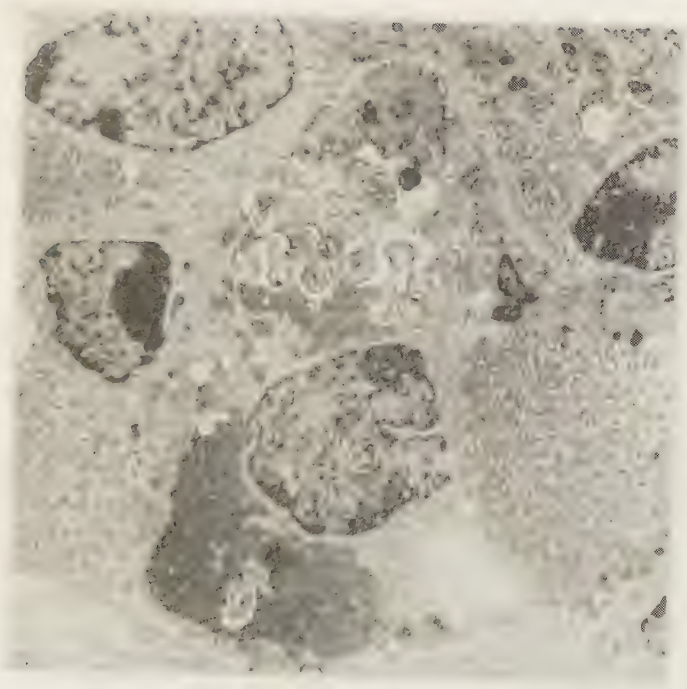


Abb. 14:
29. SST + 10 Tage Explantat. Glycogenreiches zylindrisches Epithel mit Microvillisaum. Reife Lamellarkörper, basal gelegene Vorstufen. 7 200 x

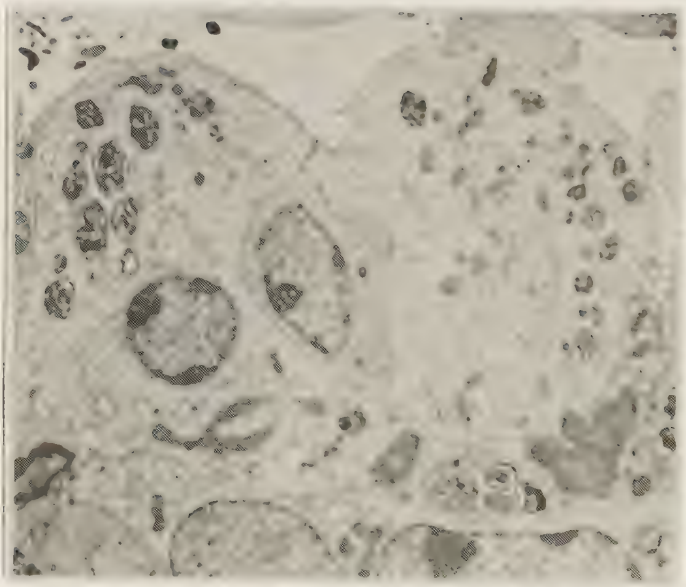


Abb. 15:

[illegible] Tage Explantat. Kubisches, glycogenverarmtes Epithel mit apikaler Haubenbildung und einigen Microvilli. Reife Lamellarkörper im Zytoplasma. 6 500 x

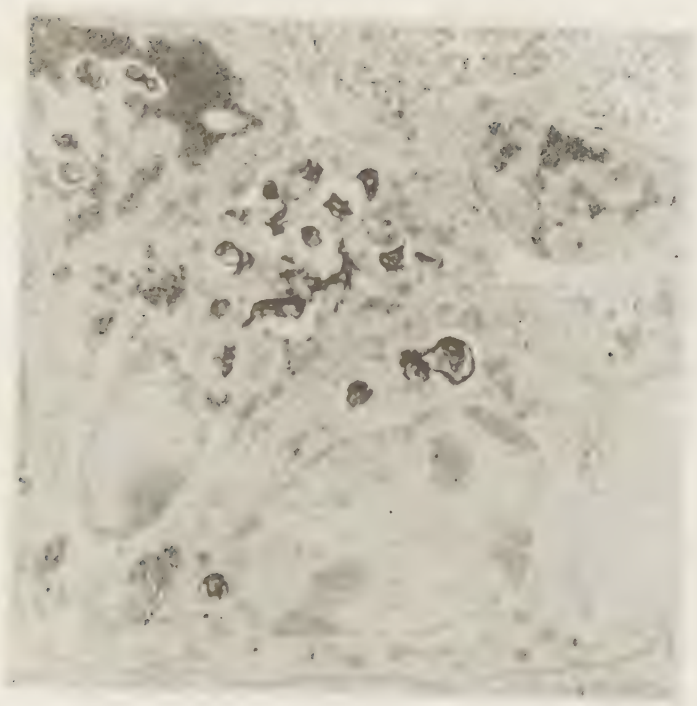


Abb. 16:
25. SST + 15 Tage Explantat. Kubisches bis zylindrisches Epithel mit deutlich reduziertem Glycogengehalt und reifen, groblamellären Einschlüssen. Deutliche Haubenbildung, kurze Microvilli. 8 500 x

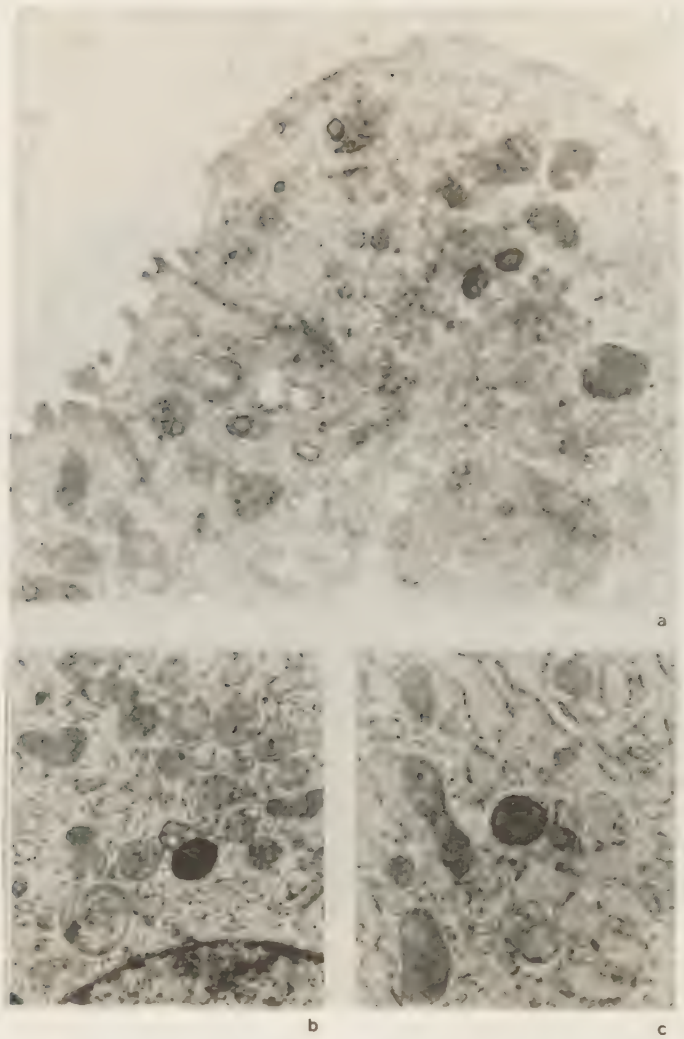


Abb. 17:
25. SST + 9 Tage Explantat. Glycogenverarmtes Epithel mit größeren Aggregaten aus lamellären und vesikulären Strukturen. a) 18 000 x; b) 16 500 x; c) 20 500 x

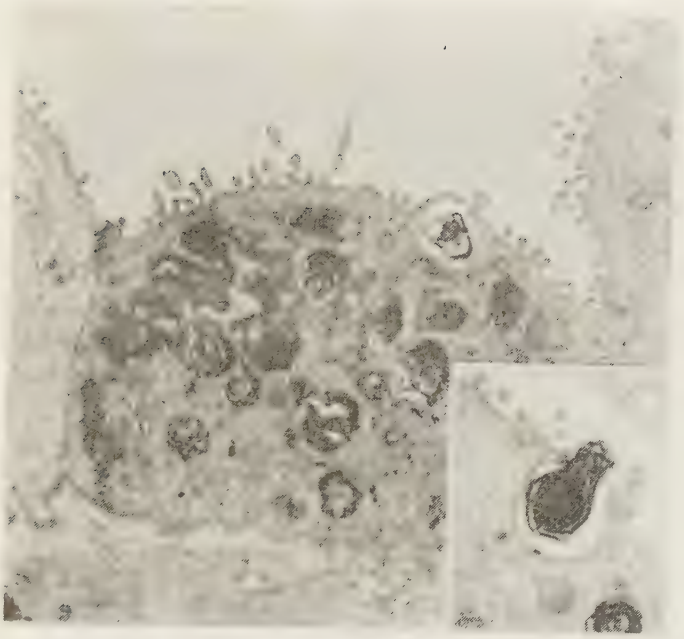


Abb. 18:
Ausschleusung eines Lamellarkörpers durch Exocytose! Reife Lamellarkörper apikal, Vorstufen überwiegend basal gelegen. 50. SST + 4 Tage Explantat, 11 000 x; Inset: 46. SST + 6 Tage Explantat, 18 000 x

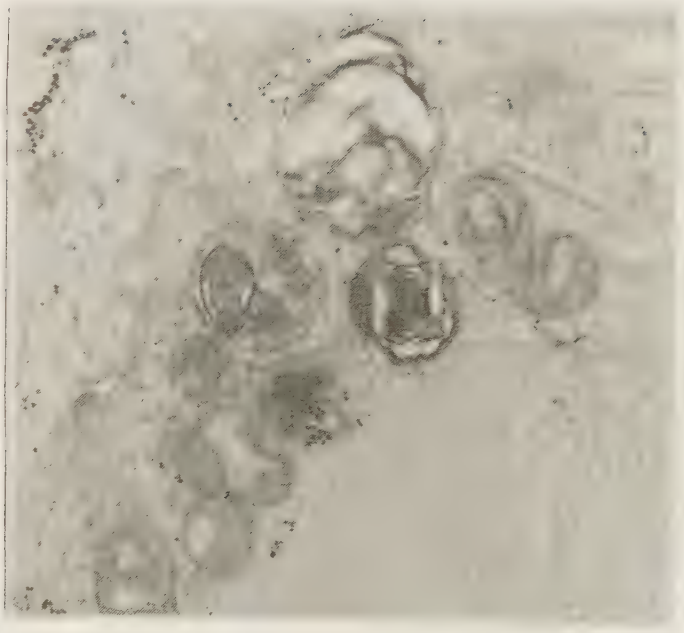


Abb. 19:

Beispiel zur Reifung der Lamellarkörper: Multivesikularkörper, reife Lamellarkörper und Übergangsformen zwischen beiden Organellen. 50. SST + 4 Tage Explantat, 47 500 x

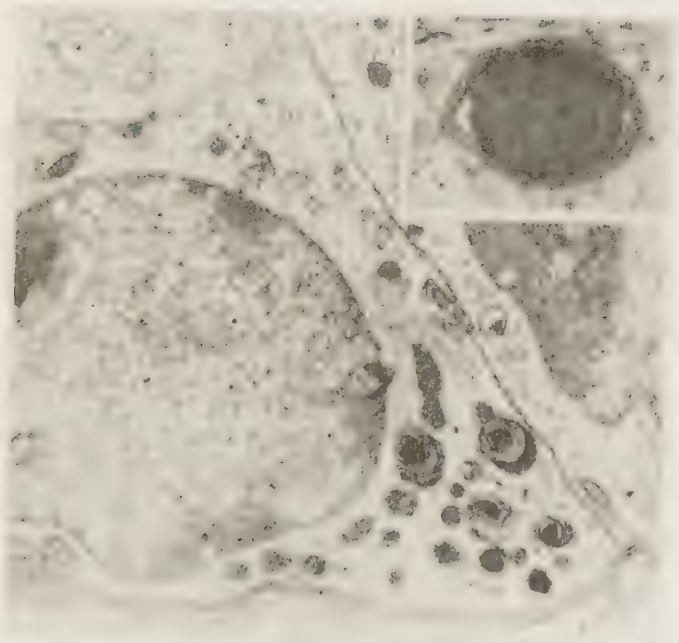


Abb. 20:
Beispiel zur Reifung der Lamellarkörper: Basal gelegene lamelläre Einschlüsse mit homogenem Anteil. 40. SST + 4 Tage Explantat, 16 000 x; Inset: 55. SST + 4 Tage Explantat, 52 000 x

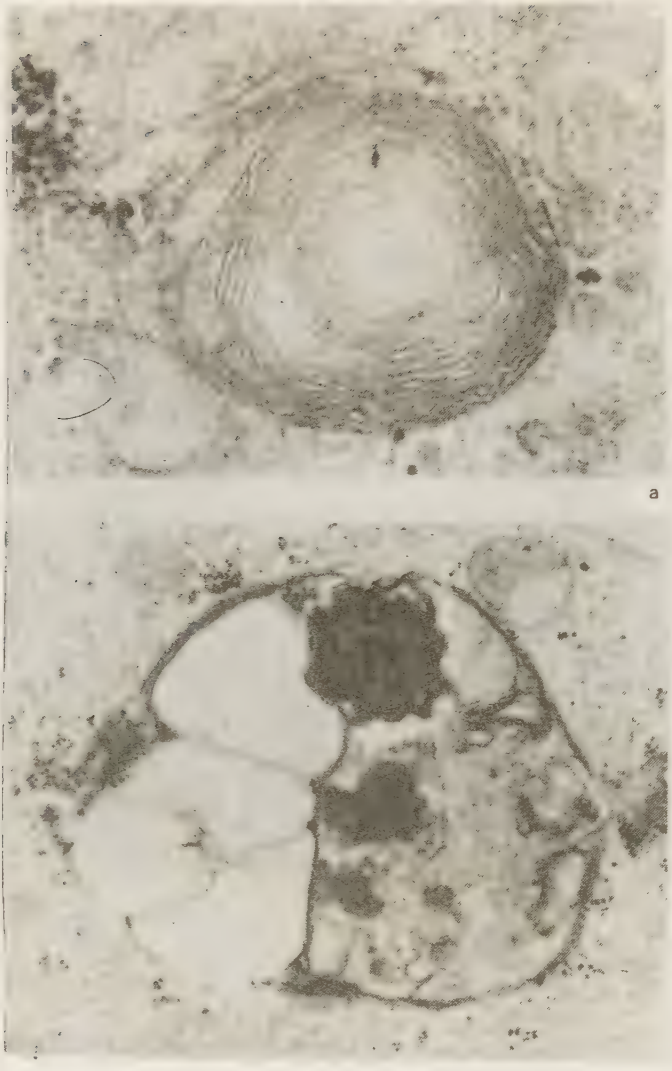


Abb. 21:
Beispiel zur Reifung der Lamellarkörper: Frei im Zytoplasma sich formierende lamelläre Strukturen. a) 29.SST + 2 Tage Explantat, 108 000 x; b) 46. SST + 4 Tage Explantat, 37 500 x

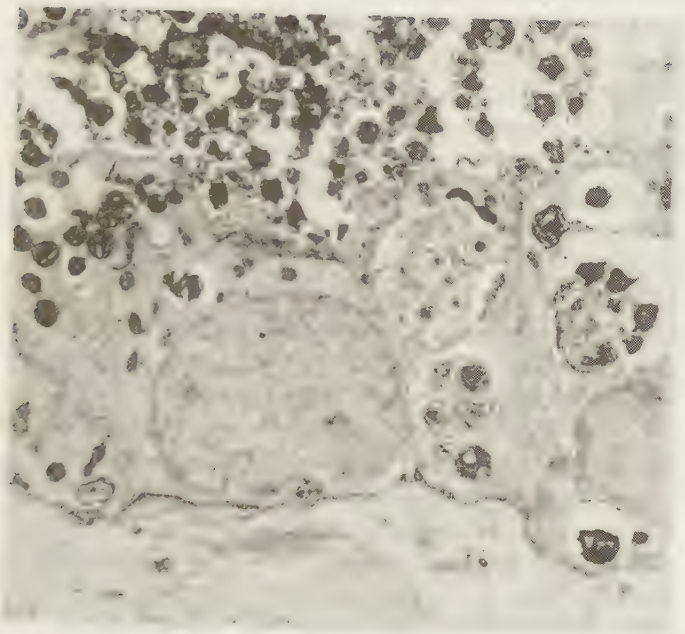


Abb. 22:
46. SST + 6 Tage Explantat. Exzessive Lamellarkörperbildung und Ausschleusung, Riesenlamellarkörper, Ansammlung lamellären osmiophilen Materials im Lumen. 7 500 x

V. Diskussion

Gewebe der fetalen Meerschweinchenlunge wurde in dreitägigen Abständen in allen Phasen der Lungenreifung explantiert und bis zu 18 Tage kultiviert. Neben unspezifischen Reaktionen konnten licht- und elektronenmikroskopisch eine zelluläre Differenzierung und eine gewebliche Reifung beobachtet werden.

Die unspezifischen Reaktionen sind in den einzelnen Reifungsphasen in unterschiedlichem Maße ausgeprägt. Die Gewebekultur kann die Bedingungen des in utero reifenden Gewebes nur eingeschränkt reproduzieren. So führt der fehlende Gewebedruck bei dem aus dem Organverband gelösten Explantat als unspezifische Explantatveränderung zu einer Vergrößerung der präformierten Lumina. Dieses Phänomen ist besonders in den der Gasphase zugewandten Anteilen des Gewebestückes ausgeprägt und geht, wie schon NOACK, ZIMMERMANN und MERKER beobachtet haben, mit einer Abflachung des Epithels einher (117).

Das Auftreten von zentralen Gewebsnekrosen ist am ehesten als Folge einer mangelhaften Sauerstoffversorgung aufzufassen. Nach Unterbrechung des Blutstromes schreitet die Kapillarisierung im Explantat nicht weiter fort (153), und die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen muß durch Diffusion von der Peripherie gewährleistet werden.
Die Ausbildung und Annäherung des Kapillarnetzes an die epithelialen Strukturen ist nach BURRI und WEIBEL (27) mit der Bildung primärer und sekundärer Septen am Ende der Lungenreifung eng verbunden, und ihr Wegfall muß im Explantat Folgen

für die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff haben. Zudem verkürzt sich der Gasdiffusionsweg zwischen der Kapillare und dem Epithel während der Embryonalentwicklung durch eine relative Abnahme des Mesenchymanteiles (16). Dementsprechend fanden sich in den hier untersuchten Explantaten deutliche Unterschiede der Anfälligkeit des Gewebes in Abhängigkeit vom embryonalen Reifungsalter: Nekrosen waren in Kulturen von den Schwangerschaftstagen 25 bis 34 auch nach 14- bis 18-tägiger Explantation nicht nachweisbar, fanden sich dagegen ab dem 46. Schwangerschaftstag regelmässig, und zwar nach immer kürzeren Explantationszeiten.
Nach ŞOROKIN (150, 151) sind die unreifen, stark glycogenhaltigen frühembryonalen Epithelien der Lunge in der Lage, ihren Energiebedarf über anerobe Stoffwechselwege zu decken. Mit zunehmender Differenzierung und Abnahme des Glycogengehaltes der Zellen muß der Energiebedarf vermehrt aerob gedeckt werden. Hierfür ist eine Optimierung der Sauerstoffversorgung notwendig, die in utero durch eine verstärkte Kapillarisierung erreicht wird. Zum Zeitpunkt des Einsetzens der spezifischen Syntheseleistungen der Pneumozyten in der späten kanalikulären Phase ist dieser Vorgang der Vaskularisation besonders ausgeprägt. Das Ausbleiben dieser durch die Kapillarisierung gewährleisteten Sauerstoffversorgung führt im Explantat zu einer besonders kritischen Situation und zum Auftreten von Gewebsuntergängen, wie sie auch aus früheren Untersuchungen bekannt sind (23, 65, 127, 152, 156, 157, 165, 171).

Da im Explantat unter unphysiologisch erhöhten Sauerstoffspannungen eine toxische Schädigung des Epithels zumindest vereinzelt (129) beschrieben

worden ist, wurde der Sauerstoffgehalt auf 20% eingestellt. Zur weitgehenden Vermeidung von Nekrosen wurde zudem die Größe der kultivierten Gewebsstücke unter 1 mm^3 gehalten. Eine zusätzliche Verbesserung der Sauerstoffversorgung konnte durch Plazierung des Gewebes auf einem für die Bestandteile des Nährmediums durchlässigen Membranfilter unter einem dünnen Flüssigkeitsfilm mit kurzer Gasdiffusionsstrecke erreicht werden.
Gelegentlich wurden in den hier zugrunde gelegten Versuchen bereits nach ungewöhnlich kurzzeitiger Kultur Gewebsnekrosen im Explantat beobachtet, während länger kultivierte Proben des gleichen Ausgangsmaterials einen guten Erhaltungszustand aufwiesen. Diese Unregelmässigkeiten im Erhaltungszustand könnten ihre Erklärung in der Tatsache finden, daß das leicht deformierbare Membranfilter im Randbereich tiefer in das Nährmedium eintaucht, sodaß für die dort plazierten Gewebeproben die Sauerstoffdiffusionsstrecke bereits in ungünstigem Maße verlängert ist. Unter entsprechenden Bedingungen sind bei den Versuchen TROWELLs (165) Nekrosen nicht beobachtet worden.

Darüberhinaus ist anzunehmen, daß eine weitere Quelle unspezifischer Veränderungen des Explantates in der hier gewählten, ebenso wie in anderen möglichen Zusammensetzungen des Nährmediums zu suchen ist. So wurde auch von TROWELL diskutiert, daß in dem von ihm gewählten synthetischen Medium T8 das Wachstum und die Differenzierung fetalen Gewebes gefördert werden, jedoch daneben auch die Fibroblastenproliferation in reifen Organen erheblich gesteigert ist (165). Insbesondere erscheinen in älteren Gewebeexplantaten die Fibroblasten bei ausreichendem

Proteinangebot bessere Bedingungen für eine Proliferation vorzufinden als die epitheliale Gewebskomponente, die zwar eine kräftige Synthese zellspezifischer Produkte aufweist, wie sie in vivo nur in reifen Zellen und unmittelbar vor der Geburt zu beobachten ist, jedoch in der Kultur einer raschen Abnahme der Mitoserate unterliegt.

Neben der geweblichen Differenzierung ist für die Beurteilung der Reife der Lunge zum Geburtszeitpunkt das Vorhandensein einer ausreichenden Synthese und Ausschleusung von Surfactant in den Alveolarraum maßgebend (12, 58, 87). Aus diesem Grunde wurde bei der Auswertung der vorliegenden Versuchsergebnisse als Kriterium für die Reife des Lungengewebes besonderer Wert auf die Phänome der Bereitstellung reifer Lamellarkörper sowie deren Ausschleusung gelegt.

Im Vergleich zur Normalreifung der Lunge setzt die Lamellarkörperbildung im Explantat früher ein, Ausreifung und Ausschleusung der Lamellarkörper sind ebenfalls verfrüht zu beobachten. Die Größe der Beschleunigung dieses Vorganges ist abhängig vom Entwicklungsstand des Explantates, also vom Schwangerschaftstag zum Zeitpunkt der Gewebegewinnung und ist umso ausgeprägter, je früher das Gewebe explantiert worden ist.
Bei der Reifung der Meerschweinchenlunge in utero treten als Vorstufen erster lamellärer Einschlüsse dichte Körper in der glandulären Phase - reife Lamellarkörper am 49. Schwangerschaftstag - und ausgeschleustes lamelläres Material in den Lumina am 53. Schwangerschaftstag auf (140). Auch andere

Autoren bestätigen das Phänomen einer beschleunigten zellulären Reifung im Explantat. So zeigte MERKER (117) eine Zunahme elektronendichter Einschlüsse in drei Tage kultiviertem fetalen Lungengewebe der Ratte, und über ein vermehrtes Auftreten von Multivesikularkörpern sowie elektronendichten Einschlüssen in kultiviertem Epithel der Hühnerlunge (110) wurde berichtet. GROSS und Mitarbeiter (65) beobachteten eine rasche Zunahme der Lamellarkörper in den Typ-II-Pneumozyten im Explantat fetalen Lungengewebes der Ratte.

Das Studium der intrauterinen Normalreifung der Lunge des Meerschweinchens an dem gleichen auch der hier vorgelegten Untersuchung zugrunde gelegten Material (140) hat ein vorübergehendes Auftreten homogener Einschlüsse zu Beginn der glandulären Phase aufgezeigt. Dagegen wurden lamelläre Einschlußformen in dem kubischen, glycogenreichen Epithel der glandulären Phase während der Normalreifung nicht beobachtet. Der Bezug dieser homogenen Einschlüsse zu den später im heranreifenden Typ-II-Pneumozyten in enger Nachbarschaft zum Golgi-Apparat und zum glatten endoplasmatischen Reticulum auftretenden "fetalen Einschlüsse" und deren Übergangsformen aus homogenen Körpern ist ungeklärt. Die Tatsache, daß im Explantat zart lamellierte, und im Vergleichsmaterial der Normalreifung zum gleichen Zeitpunkt homogene Einschlußkörper gefunden werden, läßt einen Einfluß der Explantatbedingungen auf Anordnung und Strukturierung der Lipidkomponenten in der wässerigen Phase des Zytoplasmas innerhalb der Einschlüsse vermuten, da anzunehmen ist, daß sich die Strukturen wegen des zeitgleichen Auftretens entsprechen.

Bei früh explantiertem Material ist der Zeitpunkt des Auftretens erster Lamellarkörper-Vorstufen nicht sicher zu bestimmen, da bereits einige der unreifen hochzylindrischen Epithelzellen des kultivierten Materials feine Lamellenbündel enthalten. Da diese Zylinderepithelien sich im primitiven Bronchialbaum der embryonalen Phase finden, in späteren Stadien der Reifung jedoch normalerweise keine Zellen auftreten, die Lamellarkörper enthalten, handelt es sich während der Normalreifung wahrscheinlich um eine vorübergehende Erscheinung (140), die unter den Bedingungen der Explantation fortbestehen und sogar verstärkt werden kann. In diesem Zusammenhang gewinnen Beobachtungen von Veränderungen an Clara-Zellen im reifen Lungegewebe unter experimentellen Bedingungen (Adrenalin-induziertes Lungenödem) besondere Bedeutung (170). Bei diesen Untersuchungen wurde in Clara-Zellen das Auftreten von Myelinfiguren als unspezifische toxische Zellveränderung beschrieben.
Aufgrund dieser Phänomene und Ähnlichkeiten im histochemischen Verhalten von Typ-II-Pneumozyten und Clara-Zellen wurde die Möglichkeit der Herkunft von Typ-II-Pneumozyten aus Clara-Zellen oder gemeinsamen Vorstufen in Erwägung gezogen.

Setzt man das Auftreten lamellärer Zelleinschlüsse in Bezug zu anderen zytoplasmatischen Komponenten während der Lungenentwicklung, so fällt auf, daß bei der Entwicklung in utero der Glycogengehalt des Epithels mit zunehmender Ausreifung abnimmt (9, 21, 65, 140). In der Gewebekultur ist diese Verbindung

bei den früh explantierten Geweben offensichtlich gestört. Gewebe des 40. Schwangerschaftstages (Abb. 8) weist nach 6 Tagen Kultur Typ-II-Pneumozyten mit reifen Lamellarkörpern und nur noch spärlichen Glycogenresten im Zytoplasma auf. Weitere Merkmale reifer Typ-II-Pneumozyten wie ausgeprägte Microvilli an der lumenseitigen Oberfläche, Golgifeld mit assoziiertem endoplasmatischen Reticulum und der typischen Anordnung der Zelle im Gewebsverband sind ausgebildet. Kultiviert man jedoch Gewebe vom 25. Schwangerschaftstag (Abb. 16) über 15 Tage, so erscheinen die Zellen insgesamt noch sehr unreif: sie weisen zwar einen etwas reduzierten, jedoch noch hohen Glycogengehalt auf, Microvilli fehlen, es besteht ein apikales Schlußleistennetz, und das Zytoplasma ist organellenarm. Ein vergleichbares Verhalten ist bei der Kultivierung von Rattenlungengewebe beobachtet worden (114).

Diese Lamellarkörper-enthaltenden Zellen können aufgrund ihrer Anordnung im Epithelverband und wegen des Fehlens weiterer Differenzierungskriterien nicht reifen Typ-II-Pneumozyten gleichgesetzt werden. Möglicherweise führen das optimale Nährstoffangebot oder eine Veränderung physiologischer Sauerstoff- oder Kohlendioxydspannungen zu einer verfrühten Lamellarkörperbildung, die der Ausbildung der übrigen Kriterien der Reife des Epithels vorausgeht.

In Abhängigkeit vom Reifestand des Lungengewebes zum Zeitpunkt der Explantation entwickelt sich in der Kultur eine unterschiedliche Zusammensetzung des Epithels. So ist bei der Kultivierung von Gewebe aus dem Zeitraum um den 40. Schwangerschaftstag nach 6

Tagen eine der Normalentwicklung ähnliche Zusammensetzung und Anordnung von Pneumozyten der Typen I und II zu finden. Dagegen ist früher explantiertes Gewebe durch die Kultur ausschließlich zur Bildung von Typ-II-Pneumozyten anzuregen, - später begonnene Explantate, deren Epithel bereits eine Differenzierung in Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten aufwies - bestehen nach einigen Tagen Kultur bereits ebenfalls ausschließlich aus Typ-II-Pneumozyten. Diese Tendenz zur Dominanz von Typ-II-Pneumoyzten wurde auch bei Kulturen fetalen und reifen Lungengewebes (1, 72, 114, 117, 130, 156, 157, 171) sowie in Zellkulturen (17) beobachtet. Allerdings haben ROSE und YAJIMA (130) nach einem vorübergehenden Vorherrschen von Typ-II-Pneumozyten im Explantat nach Kultivierung über 75 Tage ein erneutes und zunehmendes Auftreten von Typ-I-Pneumozyten entsprechenden Elementen beobachtet. Bei Explantaten reifen Lungengewebes ist nach WEINHOLD und Mitarbeitern (171) der Prozeß der Umformung in kubisches Epithel vermutlich als Folge einer partiellen Depression der Mitoserate durch Zusatz von Dexamethason über einige Tage hinaus aufzuhalten.

In diesem Zusammenhang ergeben sich Parallelen zu einem grundlegenden Reaktionsmuster des reifen Alveolarepithels, das als "kubische Epitheltransformation" bezeichnet wird. Diese Epithelveränderung wird bei vielen mit einer interstitiellen Fibrose und chronischen Atelektasen einhergehenden Lungenprozessen gefunden. Sie tritt auch bei einer chronischen Sauerstoffintoxikation, bei intensiver

chronischer Kohlendioxydexposition sowie nach Kolbalt-60-Bestrahlung, bei bestimmten Virus- und Rikettsienpneumonien sowie bei Lungen-Langzeittransplantaten, bei Intoxikationen mit Paraquat und Bleomycin auf (2,73, 86, 115, 167).

Zur formalen Pathogenese der kubischen Transformation am reifen Lungengewebe besteht folgende Vorstellung: die Typ-II-Pneumozyten werden als Stammzelle für die Regeneration des Alveolarepithels in der gesunden Lunge angesehen, d.h. Typ-II-Pneumozyten sind in der Lage sich abzuflachen, auszubreiten und unter Einstellung ihrer sekretorischen Funktion die Membranfunktion des Typ-I-Pneumozyten zu übernehmen. Unter pathologischen Bedingungen ist es denkbar, daß sich Typ-I-Pneumozyten in gesteigertem Maße ablösen und durch nicht mehr entsprechende Zellen ersetzt werden. Der Zellersatz stagniert in einer Vorstufe der Enddifferenzierungsform, nämlich der des Typ-II-Pneumozyten.

Diese Vorstellung erscheint für die kubische Transformation im Explantat reifen Lungengewebes und des Gewebes der sacculären Phase übertragbar zu sein. Andererseits ergibt sich für die zahlenmässige Vermehrung der Typ-II-Pneumozyten in der Explantatsituation die Frage, ob während der embryonalen Entwicklung, in der die Vorläuferformen der Typ-I-Pneumozyten noch eine relativ geringe Flächenausbreitung aufweisen, eine "Rückbesinnung" der Typ-I-Pneumozyten zur kubischen Epithelform möglich ist, die Transformation der Zelltypen also in früheren Entwicklungsphasen noch in beiden Richtungen möglich ist.

Das Ausbleiben der Differenzierung in Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten in früh explantiertem Gewebe geht einher mit einer fehlenden oder unterwertigen geweblichen Reifung. Der Stimulus zur Differenzierung von Typ-I-Pneumozyten liegt wahrscheinlich in der Ausreifung und Annäherung des Kapillargeflechts an die Oberflächen und Bildung von Spornen und Septen.

Bezüglich der Entwicklung der Lamellarkörper aus zytoplasmatischen Strukturen scheinen im Explantat gleichartige Wege wie in der Normalentwicklung beschritten zu werden. Der hierbei offenbar im Vordergrund stehende Bildungsweg ist ein Hervorgehen von lamellären Einschlüssen aus dem Golgi-assoziierten endoplasmatischen Retikulum - offenbar zumeist über hier entstehende Multivesikularkörper (Abb. 19). Die Multivesikularkörper werden unmittelbar vor dem Erscheinen erster lamellärer Strukturen vermehrt beobachtet. Daneben treten homogene Einschlüsse im Zytoplasma auf, die sich zunehmend lamellieren. Seltener finden sich außerdem konzentrische Lamellenbildungen innerhalb der Glyocogendepots der unreifen Zellen. Mit Ausnahme der letztgenannten Strukturen, die räumlich eng an das Glycogen gebunden sind, finden sich die unreifen Vorstufen in den basalen Anteilen der Zellen, während die reifen Formen am Zellapex nahe dem Ausschleusungsort lokalisiert sind. Ein Bezug der lamellären Strukturen zu Mitochondrien ist nicht zu beobachten. Diese Vorstellung des Hervorgehens der Lamellarkörper aus Mitochondrien im Sinne eines degenerativen Prozesses (175) wurde zudem durch verschiedene Untersuchungen (40, 112) nicht bestätigt. Dagegen wurde das Hervorgehen der Lamellarkörper sowohl aus homogenen als auch aus vesikulären Einschlüssen der Zellen während der Normalreifung der Meerschweinchenlunge (140) in Übereinstim-

mung mit anderen Untersuchungen (79, 88) gesichert. SOROKIN (154) konnte die schrittweise Umwandlung der Multivesikularkörper in Lamellarkörper ebenso wie KIKKAWA und Mitarbeiter und STRATTON (89, 158) aufzeigen. Auch STRATTON (158) schließt dabei in seine Klassifikation der Vorläufer von Lamellarkörpern homogene Zelleinschlüsse ein.
Die Möglichkeit des Hervorgehens von Lamellarkörpern aus frei im Zytoplasma liegenden Phospholipidlamellen ohne Bindung an zytoplasmatische Organellen wurde von CAMPICHE und Mitarbeitern (29) erörtert. Eine zentrale Stellung der Multivesikularkörper als Vorstufe der Lamellarkörper in den Pneumozyten geht daraus hervor, daß Elemente bei Stimulation durch Pilocarpin in zeitlichem Zusammenhang vermehrt auftreten (148).

Die in den Gewebeexplantaten zu beobachtende exzessive Steigerung der Synthese osmiophilen lamellären Materials, die besonders im reifen Gewebe nach längerer Kulturdauer auftritt, führt zu einer massiven Ausschleusung und Anhäufung in den Lumina, aus denen ein quantitativ wesentlicher Abtransport offenbar nicht erfolgt (Abb. 22). Die Anhäufung von lamellärem Material in den teilweise kollabierten Lumina wurde auch von STONER (156, 157) beobachtet und führt möglicherweise zu einer Rückwirkung auf die Lamellarkörperausschleusung aus den Zellen, sodaß neben einer Anhäufung von Lamellarkörpern im Zytoplasma durch Konfluenz eine Bildung von Riesenformen zu beobachten ist. Gleichartiges wurde über embryonales Lungengewebe der Maus (130) nach längerer Kultivierung des Gewebes berichtet. Während in den Zellen, die derartige Riesenlamellarkörper enthalten, das Zytoplasma weitgehend frei von Glycogen ist, finden sich innerhalb dieser Riesenformen häufig

Einschlüsse von Glycogengranula. Dieser enge räumliche Bezug legt die Vermutung eines Zusammenhanges zwischen Glycogen und Phopholipidsynthese nahe.

Die gewebliche Reifung ist im Explantat zunächst zwar beschleunigt, aber in ihrer endgültigen Ausprägung limitiert. So können zwar begrenzte gewebliche Reifungsschritte vollzogen werden, wie etwa ausgehend vom Entwicklungsstand der glandulären Phase (Explantat vom 40. Schwangerschaftstag - Abb. 7), die Entwicklung von Merkmalen der kanalikulären Phase nach 6 Tagen Kultivierung (Abb. 8). Hierbei lassen sich zwar angedeutet Septen und Nischen erkennen, und der Mesenchymgehalt ist zugunsten des Epithelanteiles geringer geworden, die Annäherung der Kapillaren an die Basalmembran des Epithels, die gerade in der kanalikulären Phase besonders ausgeprägt ist, bleibt jedoch aus. Auch Gewebe der embryonalen Phase, das am 25. Schwangerschaftstag explantiert wurde, zeigt eine zelluläre Differenzierung und Lamellarkörperbildung nach 15 Tagen Kultur. Einzelne Merkmale der kanalikulären Phase - wie Nischen und Septen - sind andeutungsweise zu erkennen und treten damit zeitlich vorgezogen auf. Die gewebliche Struktur entspricht jedoch insgesamt weder der glandulären, noch der kanalikulären Phase. Diese Beobachtungen entsprechen Befunden, die auch von NOACK und Mitarbeitern erhoben werden konnten (117).

Eine vollständige gewebliche Ausreifung war im Explantat also nicht zu erzielen. Offenbar hat der in den Kapillaren normalerweise bestehende Blutfluß und Gefäßinnendruck für die Formgebung des peripheren Lungengewebes eine wesentliche Bedeutung.

Daneben hat die ungezügelte Proliferation des Mesenchyms im Explantat auch störende Auswirkungen auf die Morphogenese des Lungengewebes. Wie bei der Kultivierung reifen Lungengewebes (30, 43, 131, 156, 157) bereitet es insbesondere Schwierigkeiten, weit differenziertes Gewebe der sacculären Phase im Explantat in seiner Struktur zu erhalten. Die angewandten Kulturbedingungen begünstigen die Proliferation der Fibroblasten, sodaß die ursprünglich ausgebildeten Lumina der Sacculi durch Verbreiterung der interstitiellen Brücken und Septen komprimiert werden und zudem das Gewebestück insgesamt von einem zellreichen bindegewebigen Mantel umschlossen, abgerundet und am Membranfilter fixiert wird.

Der Versuch einer Einflußnahme der Explantatentwicklung durch Zusatz von Acetylcholin hat keine eindeutigen Abweichungen der Befunde an den übrigen Explantaten ergeben. Acetylcholin gelangt als Neurotransmitter des parasympathischen Nervensystems nach der Einsprossung der Nervenfasern in die fetale Lunge. Da die Reifung des intrapulmonalen Nervensystems der epithelialen Differenzierung vorausgeht (139), kann die Frage nach einer möglichen steuernden Einflußnahme des Acetylcholins bei diesen Vorgängen gestellt werden. Hierbei muß von der Existenz von Rezeptoren für die Wirksubstanz im Bereich des Epithels ausgegangen werden. Von den Acetylcholinrezeptoren wurde der nikotinische als Bindungsstelle des Neurotransmitters an der postsynaptischen Membran biochemisch bereits gut am Beispiel des elektrischen Fisches (Torpedo) untersucht. Das Rezeptorprotein konnte auch aus Muskelgewebe isoliert und angereichert werden. Während der Ontogenese kommt es an Muskelzellen zu einem Verlust extrasynaptischer, über die gesamte Zellober-

fläche verteilter Rezeptoren zugunsten der synaptisch versammelten Rezeptorstellen (82). Möglicherweise besitzen auch Zellen anderer Gewebe wie beipielsweise des Epithels zumindest während der Ontogenese extrasynaptische und damit mit den üblichen morphologischen Methoden nicht erkennbare Rezeptoren, über die das Acetylcholin Einflüsse auf Wachstum und Differenzierung während der epithelialen Lungenreifung nehmen könnte. Die experimentelle Stimulation der Bereitstellung von Surfactant im Alveolarraum mit Acetylcholin oder dem Parasympaticomimeticum Pilocarpin war in vivo morphologisch durch Zunahme und Vergrößerung der Lamellarkörper sowohl an der reifen Lunge (62) als auch durch Applikation während der Trächtigkeit (148) möglich und ließ sich auch durch Messung einer reduzierten Oberflächenspannung darstellen (36). Die applizierte Dosis wurde jedoch sehr unterschiedlich gewählt.

In der Kultur konnten an reifem bzw. geburtsreifem Lungengewebe der Ratte sowohl auf Pilocarpin als auch auf Acetylcholinzusatz kurzfristige Reaktionen wie Anstieg der Lecithin-Sekretion und Reduktion der Oberflächenspannung nachgewiesen werden (26, 72, 127). Über Untersuchungen zur Reifeförderung im Explantat liegen keine Ergebnisse vor.

Die im vorliegenden Versuch gewählten Acetylcholinkonzentrationen liegen im Bereich der Serumkonzentration des Menschen (143), allerdings unterhalb der optimalen Substratkonzentration der Acetylcholinesterase (172) im synaptischen Spalt, da bei Synapsen auf Distanz wegen der längeren Diffusionsstrecke vom Nerven zum epithelialen Zielgewebe mit Verdünnung und Abbau des Transmitters gerechnet werden muß. Das Ausbleiben einer Reifungsförderung im hier durchgeführten Experiment ist somit möglicherweise mit einer zu niedrig gewählten Konzentration zu erklären. Aus dem Schrifttum sind sowohl

kurzfristige Reaktionen auf Pilocarpin am reifen Lungengewebe in vivo und in vitro (26, 62, 127) als auch eine reifungsfördernde Wirkung in vivo (36, 148) zu entnehmen. Berichte über eine Beschleunigung der Differenzierung in der Kultur fehlen jedoch. Zudem ist der direkte Vergleich beider Substanzen wegen ihrer sehr unterschiedlichen Hydrolysierbarkeit im Gewebe nicht zulässig. Die am reifen Lungengewebe mit 10 µMol bzw. 1% Acetylcholin (26,72) erzielte kurzfristige Erhöhung der Lecithin-Sekretion läßt einen Rückschluß auf eine mögliche Reifungsförderung embryonalen Gewebes nicht zu.

VI. Zusammenfassung

Zusammenfassend hat sich aus den Ergebnissen der vorliegenden systematischen Untersuchung des Verhaltens fetalen Lungengewebes des Meerschweinchens im Explantat ergeben, daß die Entwicklungsabläufe im Explantat ähnlich, aber nicht identisch sind mit der Reifung in utero. Bei genauer Kenntnis dieser Abweichungen ist das gewählte Modell der Gewebeexplantation für ein Studium der Beeinflußbarkeit der epithelialen Lungenreifung jedoch geeignet. Die vorgelegten Ergebnisse stellen daher eine Bezugsbasis für weitere Untersuchungen der Beeinflussung der epithelialen Lungenreifung dar. Nachteil der Methode ist die Schwierigkeit, das Ausmaß von Wechselwirkungen der einzelnen Gewebskomponenten, wie sie von TARDERERA (160) festgestellt worden sind, mit morphologischen Mitteln abzugrenzen. Zum Ausschluß dieser Wechselwirkungen könnte die Zellkultur als Ergänzung eine nützliche Untersuchungsmethode darstellen.

VII. Summary

The lung tissue of fetal guinea pigs from the 25th to the 58th day of gestation was cultivated for four hours to 18 days and then examined by light and electron microscopy.

Cellular maturation and tissue differentiation are accelerated in the explantate as compared to the intrauterine development.

Tissue of the embryonic and the early glandular period differentiate to type-II-pneumocytes.

Tissue explanted during the late glandular period develops into type-I- and type-II-pneumocytes. The former are spread flatly on the surface of mesenchymal crests, the latter are located in niches.
Tissue explanted during the canalicular period forms at first type-I- and type-II-epithelial cells. Later on lamellated bodies and giant lamellar inclusions are seen in all epithelial cells and are extruded into the lumina.

Tissue of the saccular period containing differentiated type-I- and type-II-pneumocytes transforms into cuboidal epithelium, resulting in a homogenous population of type-II-pneumocytes, accompanied by formation of giant bodies and massive accumulation of intraluminal lamellar osmiophilic material.

As in utero various pathways of lamellar body development have been observed.

Non-specific reactions can be differentiated.

Additional effects of Acetylcholine and Physostigmin have not been demonstrated.

VIII. Literatur

1. ADAMSON, J.Y.R.; BOWDEN, D.H.:
Reaction of cultured adult and fetal lung to prednisolone and thyroxine, Arch. Pathol. 99, 1975, 80-85.

2. ADAMSON, J.Y.R.; BOWDEN, D.H.:
Origin of ciliated alveolar epithelial cells in bleomycin-induced lung injury. Am. J. Pathol. 87, 1977, 569-580.

3. ALESCIO, T.: Osservazioni su culture organotipiche di polmone embrionale di topo. Arch. ital. Anat. Embriol. 65, 1960, 323-363.

4. ALESCIO, T.: Sul comportamento del polmone embrionale di pollo coltivato in vitro. Z. Zellforsch. 55, 1961, 123-142.

5. ALESCIO, T.; PIPERNO, E.C.: A quantitative assessment of mesenchymal contribution to epithelial growth rate in mouse embryonic lung development in vitro. J. Embryol. exp. Morph. 17, 1967, 213-227.

6. ALESCIO, T.; DANI, A.M.: The influence of mesenchyme on the epithelial glycogen and budding acitivity in mouse embryonic lung development in vitro. J. Embryol. Exp. Morph. 25, 1971, 131-140.

7. AMBRUS, C. M.; AMBRUS, J. L.; WEINTRAUB, D.H.; DONAL, D.: Experimental hyaline membran disease in guinea pigs: Therapeutic trial with human plasmin. Am. J. Dis. Child, 102, 1961, 639.

8. ANDERSON, G.W.: Pathologic observations on atelectasis with hyaline-like membrane. Bull. NY Acad. Med. 31, 1955, 159-162.

9. ANGELI, F.; DE BIASE, G.: Lineamenti di citochimica nel polmone fetale e alla nascita come premessa a problemi di citopatologia polomonare. Arch. Anat. Patol. Med. Clin. 19, 1953, 339-377.

10. ARONSON, J.F.: Rat lung maturation in culture. Annual Meeting of the Tissue Culture Association 1981, In Vitro 17, 1981, 205-206.

11. ASKIN, F.B. and KUHN, C.: The cellular origin of pulmonary surfactant. Lab. Invest. 25, 1971, 260-268.

12. AVERY, M.E.; MEAD, J.: Surface properties in relation to atelectasis and hyaline memorane disease. Am. J. Dis. Child, 97, 1959, 517-523.

13. AYDELOTTE, M. B.: Respiratory tract, In: Willmer, E.N., Cells and Tissue Culture, Academic Press, London, New York, 1965, 569-589.

14. BALIS, J.U.; PAGAST, P.; McKEEVER, L.; SHELLEY, S.: Perinatal reactions of the rabbit lung to maternal endotoxemia. Lab. Invest. 33, 1975, 287-297.

15. BALLARD,P.L.: Hormonal influences during fetal lung development. In: Metabolic activities of the lung. (Ciba Foundation Symposion 78), Excerpta Medica 1980, 251-274.

16. BARNARD, W.G.; DAY, T.D.: The development of the terminal air passage of the human lung. J. Pathol. Bacteriol. 45, 1937, 67-73.

17. BASEMAN, J.B.; HAYES, N.S.; GOLDMAN, W.E.; COLLIER, A.M.: Mucus and surfactant synthesis and secretion by cultured hamster respiratory cells. Environmental Health Perspectives 35, 1980, 139-146.

18. BLÜMCKE, S.; SCHMIDT, R.: Die Innervation der Lunge. Praxis und Klinik der Pneumologie 11, 1978, 683-748.

19. BORGHESE, E.: Organ differentiation in culture. In: W.D. McELROY and B. GLASS (Eds.). A symposium on the chemical basis of development. Baltimore, Johns Hopkins Press 1958, 704-773.

20. BORGHESE, E.; ALESCIO, E. T.; CASSINI, A.: Experiments on induction and effect of gamma radiation in mouse lung development in vitro. In: Cinemicrography in cell biology. ROSE, G.G. (Ed.),London,New York, Academic Press 1963, 201-226.

21. BOYDEN, E.A.: Development and Growth of the Airways. In: Development of the lung. HODSON, W.A. (Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, Basel 1977, 3-35.

22. BRADLEY, R.; WRATHALL, A.E.; Barker (neonatal respiratory distress) syndrome in the pig: the ultrastructural pathology of the lung. J. Pathol. 122, 1977, 145-151.

23. BRESCH, D.: Récherches préliminaires sur des associations d'organes embryonnaires de poulet en culture in vitro. Bull. biol. France et Belg. 89, 1955, 179-188.

24. BRUNS, P.D.; SHIELDS, L.V.: The pathogenesis and relationship of the hyaline-like pulmonary membrane to premature neonatal mortality. Am. J. Obstet. Gynecol. 61, 1951, 953-965.

25. BROWN, B. J.; GABERT, H. A.; STENCHEVER,M.A.: Respiratory Distress Syndrome, Surfactant Biochemistry, and Acceleration of Fetal Lung Maturity: A Review. Obstetrical and Gynecological Survey, 30, 1975, 71-90.

26. BROWN, L.A.; LONGMORE, W.J.: Adrenergic and cholinergic regulation of lung surfactant secretion in the isolated perfused rat lung and in the alveolar type II cell in culture. J. Biol. Chem., 256, 1981, 66-72.

27. BURRI, P.H.; WEIBEL, E.R.: Ultrastructure and morphometry of the developing lung. In: Development of the lung, HODSON, W.A. (Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, Basel 1977, 215-268.

28. CAFFIER, P.: Die embryonale Menschenlunge im Explantat. Archiv für Exp. Zellforschung 10, 1931, 267-298.

29. CAMPICHE, M.A.; GAUTIER, A.; HERNANDEZ, E.; REYMOND, A.: An electron miscroscope study of the fetal development of human lung. Pediatrics 32, 1963, 976-994.

30. CARLETON, H.M.: On growth, phagocytosis and other phenomena in tissue cultures of fetal and adult lung. Phil. Trans. B, 213, 1925, 365-393.

31. CHEN, J.M.: The cultivation in fluid medium of organised liver, pancreas and other tissues of foetal rats. Experimental Cell Research 7, 1954, 518- 529.

32. CHESTERMAN, F.C.; FRANKS, L.M.: Heterotransplantation and organ culture of human embryonic lungs. J. Pathol. Bacteriol. 79, 1960, 123-129.

33. CLEMENTS, J.A.: Surface tension of lung extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 95, 1957, 170-172.

34. CONEN, P.E.; BALIS, J.U.: Electron Microscopy in Study of lung development.
The anatomy of the developing lung. John Emery. William Heinemann Medical Books. LTD. 1969, 18-48.

35. COOPER, G.; SCHILLER, A.L.:
Anatomy of the guinea pig, Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, 1975.

36. CORBET, A.J.S.; FLAX, P.; RUDOLPH, A.J.: Reduced surface tension in lungs of fetal rabbits injected with pilocarpine. J. Appl. Physiol. 41, 1976, 7-14.

37. CORSSON, G.; ALLEN, C.R.: Acetylcholin: its significance in controlling ciliary activity of human respiratory epithelium in vitro. J. Appl. Physiol., 14, 1959, 901-904.

38. CROISILLE, Y.: Action de différents extraits sur l'embryon de poulet et sur des organes embryonnaires cultivés in vitro. Arch. anat. microscop. et morphol. exptl. 47, 1958, 359-400.

39. DAMERON, F.: Role du mésenchyme dans la différenciation de l'ébauche épithéliale du poumon embryonnaire de poulet en culture in vitro. Path. Biol. (Paris) 10, 1962, 811-816.

40. DAMERON, F.: Etude expérimentale de l'organogenese du poumon: nature et specifité des interactions epitheliomesenchumateuses. J. Embryol. Exp. Morphol. 20, 1968, 151-167.

41. DANI, A.M.: L'inizio dell' abbozzo polmonare nel topo studiato median te la cultura in vitro. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 126, 1967, 289-302.

42. DAVIS, J.A.; STAFFORD, A.: Respiratory distress in newborn rabbits. Biol. Neonate 7, 1964, 129-140.

43. DAVIS, J.M.G.: The structure of guinea-pig lung maintained in organ culture. Brit. J. Exp. Path. 48, 1967, 371-378.

44. DE, T.D.; ANDERSON, G.W.: The experimental production of pulmonary hyaline-like membranes with atelectasis. Am. J. Obstet. Gynecol. 68, 1954, 1557-1567.

45. DIJKSTRA, C.: Über die Lungeninnervation. Acta Neuroveg. (Wien) 29, 1966, 552-578.

46. DIJKSTRA, C.: Über die vegetative Innervation und Regulation in den Lungen (On the autonomic innervation and regulation in the lungs. A histological and histochemical investigation). Acta Neuroveg (Wien) 30, 1967, 383-396.

47. DOUGLAS, W.H.; DEL VECCHIO, P.; TEEL, R.W.; JONES, R.M.; FARRELL, P.M.: Culture of type II alveolar lung cells. Lung Cells in Disease, Ed. A. Bonhuys, 1976, 53-67.

48. EAGLE, H.: Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science 130, 1959, 432-437.

49. EHARD, H.: Vergleichende Untersuchungen zur Anatomie der Lungen von kleinen Versuchstieren (Kaninchen, Meerschweinchen, Albino-Ratten, Syrische Goldhamster). Vet. Med. Diss. Hannover, 1973.

50. EKELUND, L.; ARVIDSON, G.; EMANUELSSON, H.: Effect of cortisol on human fetal lung in organ culture. A biochemical, electron-microscopic and autoradiographic study. Cell. Tiss. Res. 163, 1975, 263-272.

51. EL-BERMANI, A.W.; McNARY, W.F.; BRADLEY, D.E.: The distribution of acetylcholinesterase and catecholamine containing nerves in the rat lung. Anat. Rec., 167, 1970, 205-211.

52. EL-BERMANI, A.W.: Innervation of the rat lung. Acetylcholinesterase containing nerves of the bronchial tree. Am. J. Anat. 137, 1973, 19-29.

53. EL-BERMANI, A.; GRANT, M.: Acetylcholinesterase-positive nerves of the rhesus monkey bronchial tree. Thorax 30, 1975, 162-170.

54. ELLMAN, G.L.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 1961, 88-95.

55. EMERY, J.: Embryogenesis. Chap. 1. In: J. Emery (Ed.): The anatomy of the developing lung. Lavenham Press, Lavenham, 1-7.

56. FARRELL, P.M.; HAMOSH, M.: The biochemistry of fetal lung development. Clin. Perinatol. 5, 1978, 197-229.

57. FONNUM, F.: Review of recent progress in the synthesis, storage and release of acetylcholine. Cholinergic mechanismus, Waser Raven Press, 1975, 145-159.

58. GANDY, G.; JACOBSON, W.; GAIRDNER, D.: Hyaline membrane disease. I. Cellular changes. Arch. Dis. Child. 45, 1970, 289-310.

59. GIBSON, E.A.; BLACKMORE, R.J.J.; WIJERATINE, W.V.S.; WRATHALL, A.E.: The "barker" (neonatal respiratory distress) syndrome in the pig: its occurence in the field. Vet. Rec. 98, 1976, 476-479.

60. GLASS, L.; RAJEGOWDA, B.; EVANS, H.E.: Absence of respiratory distress syndrome in premature infants of heroine-addicted mothers. Lancet 2, 1971, 685-686.

61. GLUCKSMANN, A.: Mitosis and degeneration in the morphogenesis of human foetal lung in vitro. Z. Zellforsch. 64, 1964, 101-110.

62. GOLDENBERG, V.E.; BUCKINGHAM, S.; SOMMERS, S.C.: Pilocarpine stimulation of granular pneumonocyte secretion. Lab. Invest. 20, 1969, 147-158.

63. GRABITZ, K.; HERBST, R.; HODER, D.; KOBER, H.J.; MULTIER-LAJOUS, A.-M.: Oberflächenstruktur der Lungenepithelien des Kaninchens während der Entwicklung. Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. 10, 1977, 539-544.

64. GRANDE, N.R.; DOS SANTOS, T.C.: New aspects of cholinergic innervation of the canine lung. Arch. Anat. Histol. Embryol. 55, 1972, 399-401.

65. GROSS, I.; WALKER SMITH, G.J.; MANISCALCO, W. M.; CZAJKA, M. R.; WILSON, C.; ROONEY, S.A.: An organ culture model for study of biochemical development of fetal rat lung. J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol. 45, 1978, 335-362.

66. GROSS, J.; WILSON, C.M.; INGLESON, L.D.; BREHIER, A.; ROONEY, S.A.: The influence of hormones on the biochemical development of fetal rat lung in organ culture. I. Estrogen. Biochim. Biophys. Acta. 575, 1979, 375-383.

67. GROSS, I.; WILSON, C. M.; INGLESON,L.D.; BREHIER, A.;ROONEY, S.A.: Fetal lung in organ culture. III. Comparison of dexamethasone, thyroxine, and methylxanthines. J. Appl. Physiol.: Respirat. Environ. Exercise Physiol. 48, 1980, 872-877.

68. GROVER, J.W.: The relation between embryonic age of dissociated chick lung cells and their capacity for reaggregation and histiogenesis. Exp. Cell Res. 24, 1961, 171-173.

69. GROVER, J.W.: The enzymatic dissociation and reproductible reaggregation in vitro of 11-day embryonic chick lung. Develop. Biol. 3, 1961, 555-568.

70. GROVER, J.W.: The Influence of age and environmental factors on the behaviour of reaggregated embryonic lung cells in culture. Experimental Cell Research 26, 1962, 344-359.

71. GUERRERO, R.R.; ROUNDS, D.E.; BOOHER, J.: An improved organ culture method for adult mammalian lung. In Vitro 13, 1977, 517-524.

72. HACKNEY, J.D.; BILS, R.F.: Organotopic culture of mammalian lung-studies on morphology, ultrastructure, and surfactant. Aspen Emphysema Conf. 9, 1968, 13-34.

73. HAGLIN, J.J.; RINZ, E.; BAKER, R.C.; ANDERSON, W.R.: Histologic studies of human lung allo-transplantation. Morphology in lung tansplantation, Karger, Basel, 1973, 13-22.

74. HALLMANN, M.; GLUCK, L.: Development of the fetal lung. J. Perinat. Med. 5, 1977, 3-31.

75. HALLMANN, M.; TERAMO, K.; KANKAANPÄA, K.; KULOVIC, M.V.; GLUCK, L.: Prevention of respiratory distress syndrome: Current view of fetal lung maturity studies. Am. Clin. Res. 12, 1980, 36-45.

76. HAWKINS, D.F.; SHILD, H.O.: The action of drugs on isolated human bronchial chains. Brit. J. Pharmacol. 6, 1951, 682-690.

77. HAYEK, H. von. The Human Lung. Hafner Publishing Company Inc., New York, 1960.

78. HERBST, R.; MULTIER-LAJOUS, A.-M.; BLÜMCKE,S.: Ultrastrukturelle Untersuchungen zur Frühentwicklung der Kaninchenlunge. Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. 10, 1977, 531-538.

79. HERBST, R.; MULTIER-LAJOUS, A.-M.; HEINE, G.: Vergleichende Untersuchungen zur Lungenreifung beim Menschen und Kaninchen. Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. 12, 1979, 61-66.

80. HITCHCOCK, K.R.: Lung development and the pulmonary surfactant system: Hormonal Influences. Anat. Rec. 198, 1980, 13-34.

81. HÖFLIGER, H.; STRITTMATTER-BOLLETER, E: Die Entwicklung der Feinstruktur der Kaninchen- und Meerschweinchenlunge und ihre Beziehung zur Entwicklungsreife der Neugeborenen. Arch. Schweizer Tierheilkunde, 112, 1970, 428-435.

82. HUCHO, F.: Einführung in die Neurochemie, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Basel, 1982.

83. JEFFREY, P.K.; REID, L.M.: Ultrastructure of airway epithelium and submucosal glands during development In: Development of the lung. HODSON, W.A. (Ed.) Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 1977, 87-134.

84. DE JONG, B.J.; DE HAAN, J.: Organ and tissue differentiation in perfused cultures of explants from the oesophagus-stomach-trachea complex of young chicken embryos. Acta Neerl. Morphol. 5, 1943, 26-51.

85. JUNG, S.: Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere. G. Fischer-Verlag, Stuttgart, 1962.

86. KAPANCI, Y.; WEIBEL, E.R.; KAPLAN, H.P.; ROBINSON, F.R.: Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. Lab. Invest. 20, 1969, 101-118.

87. KIKKAWA, Y.; MOTOYAMA, E.K.; COOK, C.D.: The ultrastructure of the lungs of lambs. Am. J. Pathol., 47, 1965, 877-903.

88. KIKKAWA, Y.; MOTOYAMA, E.K.; GLUCK, L.: Study of the lungs of fetal and newborn rabbits. Am. J. Pathol., 52, 1968, 177-209.

89. KIKKAWA, Y.; SPITZER, R. : Inclusion bodies of type II alveolar cells: species differences and morphogenesis. Anat. Rec., 163, 1969, 525-542.

90. KIKKAWA, Y.; KAIBARA, M.; MOTOYAMA, E.K.; ORZALESI, M.M.; COOK, C.D.: Morphologic development of fetal rabbit lung and its acceleration with cortisol. Am. J. Pathol. 64, 1971, 423-433.

91. KITAMURA, S.: The guinea-pig lung strip as in vitro preparation of peripheral airways. Kokyu To Junkan 25, 1977, 799-802.

92. KOLESNICHENKO, T.S.; NIKONOVA, T.V.: Organic cultivation of the embryonal pulmonary tissue of man. Byull. Eksp. Biol. 80, 1975, 99-102.

93. KOLESNICHENKO, T.S.: Proliferative activity of the epithelium of organ cultures from the lungs of embryonic mice in health and under the action of urethane. Biull. Eksp. Biol. Med. 90, 1980, 220-222.

94. KOTAS, R.; AVERY, M.: Accelerated appearance of pulmonary surfactant in the fetal rabbit. J. Appl. Physiol. 30, 1971, 358-361.

95. KUNSTYR, I.; HEIMANN, W.; GARTNER, K.: Meerschweinchen als Liebhabertiere und Patienten. Ethologie, Physiologie und Pathologie. Tierärztliche Praxis 5, 1977, 99-113.

96. LAJOUS, A.-M.; HEINE, -M.; HERBST, R.; GROSSE-SIESTRUP, C.: Die Entwicklung der Lungenepithelien beim Meerschweinchen. Beitr. elektronenmikroskop. Direktabb. Oberfl. 14, 1981, 513-522.

97. LANG, F.J.: Über die Gewebskulturen der Lunge. Archiv für Exp. Zellforschung (Jena) 2, 1926, 93-122.

98. LASNITZKI, I.: The effect of 3,4-benzpyrene on human foetal lung grown in vitro. Brit. J. Cancer 10, 1956, 510-516.

99. LASNITZKI, I.: The effect of carcinogens, hormones and vitamins on organ cultures. Inter. Rec. Cytol. 7, 1958, 79-121.

100. LASNITZKI, I.: The action of hormones on cells and organ cultures. E.N. Willmer. Cells and tissue in culture. Academic Press, London, New York, 1965, 591-658.

101. LESLIE, I.; SINCLAIR, R.: The action of thyroxine and triiodothyronine on human cells growing in tissue culture. Experimental cell research 17, 1959, 272-285.

102. LIGGINS, G.C.; HOWIE, R.N.: A controlled trial of antepartum glucocorcoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. Pediatrics 50, 1972, 515-525.

103. LOFFREDO SAMPAOLO, C.; SAMPAOLO, G.: Colture organotipiche di polmone embrionale di pollo. Alcuni aspetti istologici e istochimici. Boll. soc. ital. biol. sper. 32, 1956, 797-801.

104. LOFFREDO SAMPAOLO, C.; SAMPAOLO, G.: Indagini sulla differenziazione in coltura organotipica della trachea di embrioni di pollo. Boll. soc. ital. biol. sper. 33, 1957, 173-176.

105. LONGMORE, W.J.; NIETHE, C.M.; SPRINKLE, D.J.; GODINEZ, R.I.: Effect of CO_2 concentration on phospholipid metabolism in the isolated perfused rat lung. J. Lipid Res. 14, 1973, 145-151.

106. MAHAFFEY, L.W.; ROSSDALE, P.D.: A convulsive syndrome in newborn foals resembling pulmonary syndrome in the newborn infant. Lancet, i, 1959, 1223-1225.

107. MANKTELOW, B.W.; BASKERVILLE, A.: Respiratory distress syndrome in newborn puppies. J. Small Anim. Pract., 13, 1972, 329-332.

108. MASON, R.J.; WILLIAMS, M.C.; GREENLEAF, R.D.: Isolation of lung cells. Lung cells in disease. Ed. A. Bonhuys. 1976. Elsevier/North-Holland Biochemical Press, 39-52.

109. MASSARO, D.: In vivo protein secretion by lung. J. Clin. Invest. 56, 1975, 263-271.

110. MERKER, H.J.; ZIMMERMANN, B.: Das elektronenmikroskopische Bild der Epithelzellen aus embryonalen Hühnerlungen in der Gewebekultur. Beitr. Klin. Tuberk. 139, 1969, 155-169.

111. MERKER, H.J.; ZIMMERMANN, B.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Bisolvon auf das Lungenepithel von Hühnerembryonen in der Kultur. Beitr. Klin. Tuberk. 139, 1969, 170-182.

112. MEYRICK, B.; BEARN, J.G.; COBB, A.G.; MONKHOUSE, C.R.; REID, L.: The effect of in utero decapitation on the morphological and physiological development of the fetal rabbit lung. J. Anat. 119, 1975, 517-535.

113. MEYRICK, B.; REID, L.M.: Ultrastructure of alveolar lining and its development. In: Development of the lung, Hodson, W.A. (Ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 1977, 135-214.

114. MINOR, R.R.: Organ cultures of embryonic lung tissues. J. Pediatr. 95, 1979, 910-916.

115. NAGAISHI, C.: Functional anatomy and histology of the lung. University Park Press. Baltimore, 1972, 29 - 65.

116. NEUFELD, N.D.; SEVANIAN, A.; BARRETT, C.T.; KAPLAN, S.A.: Inhibition of surfactant production by insulin in fetal rabbit lung slices. Pediat. Res. 13, 1979, 752-754.

117. NOACK, W.; ZIMMERMANN, B.; MERKER, H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an embryonalen Rattenlungen (Tag 15) in der Gewebekultur. Z. Anat. Entwicklungsgesch.132, 1970, 325-338.

118. NORTHWAY, W.H.; ROSAN, R.C.; PORTER, D.Y.: Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane disease: bronchopulmonary dysplasia. N. Engl. J. Med. 276, 1967, 357-368.

119. OGAWA, J.; YAMAGUSHI, H.: Hyaline membrane in the lungs of premature newborn mammals. Nagoya J. Med. Sci. 7, 1961, 17-26.

120. PATON, W.D.M.: The mechanism of action of acetylcholine. 2nd Int. Pharmacol Meeting, Vol. 6, 1965, 71-79.

121. PATTLE, R.E.: Properties, function and origin of the alveolar lining layer. Proc. Roy. Soc., B, 148, 1958, 217-240.

122. PATTLE, R.E.: The formation of a living film by fetal lungs. J. Pathol. Bacteriol. 82, 1961, 333-343.

123. PATTLE, R.E.: Inter-species differences in surface properties of the lung. Proc. R. Soc. Med., 66, 1973, 385-386.

124. PAUL, J.: Zell- und Gewebekulturen. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1980.

125. PIPERNO, E.C.: Osservazioni sulla crescita dell' epitelio polmonare in vitro. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 125, 1966, 227-244.

126. PIRIE, H.M.; SELMAN, J.E.: Acute respiratory distress syndrome in a premature calf. Vet. Rec. 85, 1969, 293-294.

127. PYSHER, T.J.; KONRAD, K.D.; REED, G.B.: Effects of hydrocortisone and pilocarpine on fetal rat lung explants. Lab. Invest. 37, 1977, 588 - 594.

128. READ, J.M.: The intra-uterine growth-cycles of the guinea-pig. Archiv f. Entw.-Mechanik der Organismen 35, 1913, 708-723.

129. RESNICK, J.S.; BROWN, D.M.; VERNIER, R.L.: Oxygen toxicity in fetal organ culture. II. The developing culture. Lab. Invest. 31, 1975, 665-677.

130. ROSE, G.G.; YAJIMA, T.: Fetal mouse lung in circumfusion system cultures. In Vitro 13, 1977, 749-768.

131. ROSIN, A.: Studies on lung tissue in vitro with special reference to the nature of the lining cells of the alveolus. Anat. Rec. 97, 1947, 447-461.

132. ROSSDALE, P.D.; PATTLE, R.E.; MAHAFFEY, L.W.: Respiratory distress in a newborn foal with failure to form lung lining film. Nature, 215, 1967, 1498- 1499.

133. RUCHKOVSKI, B.S.: Differentiation of embryonic lung tissue in monolayer culture. Tsitologiia 14, 1972, 386-389.

134. RUSSEL, J.A.: Responses of isolated canine airways to electric stimulation and acetylcholine. J. Appl. Physiol. 45, 1978, 690-698.

135. SAMPAOLO, G.; LOFFREDO SAMPAOLO, C. Observations histologiques sur le poumon de foetus de Cobaye cultivé in vitro. Compt. rend. assoc. anat. 45, 1959, 707-714.

136. SAMPAOLO, L.C.; SAMPAOLO, G.: Récherches sur l'évolution de l'ébauche du poumon cultivée in vitro sur millieux a homogénat de poumon embryonnaire. C.R. Ass. Anat. 135, 1966, 607-609.

137. SCARPELLI, E.M. The Surfactant System of the Lung. Lea and Febiger, Philadelphia, 1968.

138. SCHMIDT, G. Weiße Mäuse, Ratten, Meerschweinchen. Lehrmeister-Bücherei Nr. 698, Albrecht Philler Verlag, Minden, 1959.

139. SCHMIDT, R.; REINHARDT, S.; SCHNOY, N.; SCHOLMAN, J.; LINDEMANN, U.: Entwicklung und Ultrastruktur frühfetaler intrapulmonaler Ganglien und Synapsen des Meerschweinchens. Sechster Europäischer Anatomen-Kongress, Hamburg 1981. Acta Anatomica 111, 1981, 137.

140. SCHNOY, N.; SCHMIDT, R.; REINHARDT, S.; SCHOLMAN, J.; LINDEMANN, U.: Ultrastrukturelle Untersuchungen der epithelialen Entwicklung der Meerschweinchenlunge. I. Normale Reifung. Sechster Europäischer Anatomen-Kongress, Hamburg 1981. Acta Anatomica 111, 1981, 137.

141. SCHOPPER, W.: Über das Verhalten des Lungengewebes in der Gewebekultur. Arch. Exptl. Zellforsch. 19, 1937, 326-328.

142. SCHREIDER, J.P.: Morphology of the guinea-pig respiratory tract. Anat. Rec. 196, 1980, 313-321.

143. SCUDAMORE, H.H.; VORHAUSE, L.J.II; KARK, R.M.: Accetylcholine and cholin esterase in blood of patients suffering with bronchial asthma. J. Lab. Clin. Med. 37, 1951, 860-866.

144. SHAFFER, B.M.: The culture of organs from the embryonic chick on cellulose-acetat fabric. Exp. Cell. Res. 11, 1956, 244-248.

145. SHARAN, R.K.: Acinar morphology in normal guinea-pig lung. Indian. J. Chest. Dis. 14, 1972, 15-21.

146. SIMNETT, J.D.; FISHER, J.M.; HEPPLESTON, A.G.: Tissue-specific inhibition of lung alveolar cell mitosis in organ culture. Nature 223, 1969, 944-946.

147. SMITH, B.; TORDAY, J.; GIROUD, C.: Evidence for different gestation-dependent effects of cortisol on cultured fetal lung cells. J. Clin. Invest. 53, 1974, 1518-1526.

148. SMITH, D. M.; SHELLEY, S. A.; BALIS, J. U.: The maturation of the rabbit fetal lung following maternal administration of pilacarpine. Am. J. Anat. 154, 1979, 163-178.

149. SOROKIN, S.: The development in vitro of mammalian lungs. Anat. Rec. 134, 1959, 642.

150. SOROKIN, S.; PADYKULA, U.; HERMAN, H.: Comparative histochemical patterns in developing mammalian lungs. Dev. Biol. 1, 1959, 125-151.

151. SOROKIN, S. P.: Histochemical events in developing human lungs. Acta. Anat. 40, 1960, 105-119.

152. SOROKIN, S.P.: A study of development in organ cultures of mammalian lungs. Develop. Biol. 3, 1961, 60-83.

153. SOROKIN, S.P. Recent work on developing lungs. In R.L. de Haan and H. Ursprung (eds.): Organogenesis. Holt, New York, 1965, 467-491.

154. SOROKIN, S.P.: A morphologic and cytochemical study on the great alveolar cell. J. Histochem. Cyto-chem. 14, 1966, 884-897.

155. SOROKIN, S.P. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs. J. Cell. Sci. 3, 1968, 207-230.

156. STONER, G.D.; HARRIS, C.C.; AUTRUP, H.A.; TRUMP, B.F.; KINGSBURY, E.W.; MYERS, G.A.: Explant culture of human peripheral lung. I. Metabolism of Benzopyren.. Lab. Invest. 38, 1978, 685-692.

157. STONER, G.D.: Explant culture of human peripheral lung. Methods of Cell Biol. 21A, 1980, 65-77.

158. STRATTON, C.J.: Multilamellar body formation in mammalian lung: An ultrastructural study utilizing three lipid retention procedures. J. Ultrastruct. Res. 52, 1975, 309-320.

159. STRITTMATTER-BOLLETER, E. Die Entwicklung der prä- und postnatalen Feinstruktur der Kaninchen- und Meerschweinchenlunge.
Vet. med. Diss. Zürich 1970.

160. TADERERA, J.V.: Control of lung differentiation in vitro. Dev. Biol. 16, 1967, 489-512.

161. THOMBRE, D.P.: Study of lung surfactant action in guinea-pigs after vagotomy. Indian J. Physiol. Pharmacol. 22, 1978, 305-309.

162. TOOLEY, W.; GARDNER, R.; THUNG, N.; FINLEY, T.: Factors affecting the surface tension of lung extracts. Fed. Proc. 20, 1961, 428 (Abstr.).

163. TOOLEY, W.H.: Lung disease and lung development. In Development of the lung. Hodson. W.A. (Ed). Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, 1977, 589-602.

164. TOWERS, B.: The fetal and neonatal lung. Biology of Gestation. Vol. 2 (Ed. by Assali, N.S.), Academic Press, New York, 1968, 189-223.

165. TROWELL, O.A.: The culture of mature organs in a synthetic medium. Experimental cell research 16, 1959, 118-147.

166. VAKAET, L.: Étude expérimentale par la méthode de cultures d'organes des réactions de l'épithelium bronchial de l'embryon de Poulet. Arch. anat. microscop. et morph. exptl. 45, 1956, 48-64.

167. VIJEYARATNAM, G.S.; CORRIN, B.: Experimental paraquat poisening: A histological and electron-optical study on the changes in the lung. J. Pathol. 103, 1971, 123-129.

168. WAGNER, J.E.: The biology of the Guinea-pig. Academic Press, N.Y. 1976.

169. WANG, N.; KOTAS, R.; AVERY, M.; THURLBECK, W.: Accelerated appearance of osmiophilic bodies in fetal lungs following steroid injection. J. Appl. Physiol. 30, 1971, 362-365.

170. WANG, N.S.; HUANG, S.N.; SHELDON, H.; THURLBECK, W.M.: Ultrastructural changes of clara cells and type II alveolar cells in adrenalin-induced pulmonary edema in mice. A. J. Pathol. 62, 1971, 237-245.

171. WEINHOLD, P.A.; BURKEL, W.E.; FISCHER, T.V.; KAHN, R.H.: Adult rat lung in organ culture: maintenance of histotypic structure and ability to synthesize phospholipid. In Vitro 15, 1979, 1023-1031.

172. WILSON, J.B.: Acetylcholinesterase. Chap. 30. In: The Enzymes, P.D. Boyer (Ed.), Academic Press, New York, London, Vol. 4, 1960, 501-520.

173. WOLFF, E.: Les propriétés générales des organes en culture in vitro. Acta Anat. 30, 1957, 952-969.

174. WOLFF, E.: Sur une nouvelle modalité de la culture organotypique. C.R. Académie des Siences (Paris) 250, 1960, 3881-3882.

175. WOODSIDE, G.L.; DALTON, A.J.: The ultrastructure of lung tissue from newborn and embryo mice. J. Ultrastruct. Res. 2, 1958, 28-54.

176. WRATHALL, A.E.; BAILEY, J.; WELLS, D.E.; HEBERT, C.N.: Studies on the barker (neonatal respiratory distress) syndrome in the pig. Cornell Vet. 67, 1977, 543-598.

177. YOSHIDA, Y.: Fine structural identification of organoid mouse lung cells cultured on a pigskin substrate. In Vitro 16, 1980, 994-1006.

178. ZOCH, E.: Ein papierchromatographischer Schnellnachweis unterschiedlicher enzymatischer Cholinesterspaltung im Trachea- und Lungengewebe der Ratte. Z. Naturforsch. (B), 24, 1969, 644-645.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. S. Blümcke und Herrn Prof. Dr. K. Dämmrich danke ich für die Auswahl des Themas und viele hilfreiche Ratschläge und Anregungen.

Lebenslauf

23.5.1951	geboren in Berlin Vater: Dr. med. dent. Arno Frevert, Kieferorthopäde Mutter: Irmgard Frevert, geb. Worm
1958-1964	Schlüter-Grundschule, Ludwig-Cauer-Schule, Berlin
1964-1970	Schiller-Oberschule, Berlin
1970-1972	Lette-Verein, Berlin; Ausbildung zur MTA
1972-1975	Krankenhaus Heckeshorn, Berlin Tätigkeit als MTA in der Pathologie
1973-11977	verheiratet mit Jörg Lindemann
1974-1975	Gabbes Lehranstalten, Berlin; Besuch der Abendschule, Abschluß: Abitur
1976-1977	Klinikum Charlottenburg, Freie Universität Berlin; Tätigkeit als MTA in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Anaesthesie
1976-1982	FU Berlin, Studium der Veterinärmedizin, Staatsexamen Dezember 1982
1978-1979	Klinikum Charlottenburg, FU Berlin Studentische Hilfskraft im Pathologischen Institut
1979-1983	Klinikum Charlottenburg, FU Berlin Tätigkeit als MTA im Elektronen- mikroskopischen Labor des Pathologischen Instituts.
11.1.1983	Approbation